

**Untersuchungen über die Anwendung  
papierchromatographischer Methoden zur  
Erfassung eiweißgebundener  
Kohlenhydrate**

**Esther Schmid**

1960





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41555225\\_0039](https://archive.org/details/IA41555225_0039)



**Untersuchungen über die Anwendung  
papierchromatographischer Methoden zur  
Erfassung eiweißgebundener  
Kohlenhydrate**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
**Esther Schmid**  
aus Berlin-Zehlendorf

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Referent: Professor Dr. H. SCHWIEGK

Dekan: Professor Dr. H. SCHWIEGK

Tag der mündlichen Prüfung: 21.6.1960



MEINEN ELTERN ZUGEEIGNET



## I N H A L T

|                                                                                            | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| EINLEITUNG                                                                                 | 7     |
| Einteilung der kohlenhydrathaltigen Eiweisskörper                                          | 7     |
| KOHLLENHYDRATBAUSTEINE IN MENSCHLICHEN UND TIERISCHEN<br>PROTEIN-KOHLLENHYDRATVERBINDUNGEN | 10    |
| Gewinnung kohlenhydratreicher Eiweisskörper aus dem Blutserum                              | 11    |
| Die Zucker des Blutserums                                                                  | 12    |
| Veränderungen des Polysaccharidgehaltes im Serum bei verschie-<br>denen Erkrankungen       | 14    |
| DIE ANALYSE VON ZUCKERBAUSTEINEN DURCH DIE CHROMATO-<br>GRAPHIE                            |       |
| Die Entwicklung der Chromatographie                                                        | 16    |
| Chromatographie der Zucker                                                                 |       |
| Trennung an der Säule                                                                      | 17    |
| Verteilungschromatographie                                                                 | 18    |
| Papierchromatographie                                                                      | 18    |
| Methodik der Zuckerchromatographie                                                         |       |
| Substanz                                                                                   | 19    |
| Auftragen der Substanzlösung                                                               | 20    |
| Störende Stoffe                                                                            | 20    |
| Das Papier                                                                                 | 21    |
| Methoden                                                                                   | 21    |
| Apparatur                                                                                  | 22    |
| Sättigung der Chromatographiekammer                                                        | 22    |
| Temperaturkonstanz                                                                         | 22    |
| Lösungsmittel                                                                              | 22    |
| Trocknen der Chromatogramme                                                                | 24    |
| Nachweis der Zucker                                                                        | 24    |
| Auswertung der Chromatogramme                                                              | 26    |
| Aufbewahrung der Chromatogramme                                                            | 27    |

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Die Struktur der Zucker und ihr Verhalten auf dem Papierchromatogramm   | 28 |
| Anwendung der Papierchromatographie der Zucker auf organische Substrate | 29 |
| Untersuchungen der Glykoproteide des Blutserums                         | 31 |
| Hydrolyse von Glykoproteidlösungen                                      | 31 |
| Entfernung störender Stoffe mit Ionenaustauschern                       | 33 |

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN ZUR ANALYSE VON GLYKOPROTEIDEN (Nachweis von Galaktose, Mannose und Fucose)

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| Hydrolyse                                                  | 34 |
| Struktur der Zucker                                        | 35 |
| Vorbereitung der Eiweißhydrolysate für die Chromatographie | 35 |
| 1. Entfernung der Säure                                    | 35 |
| 2. Entsalzen mit Pyridin                                   | 36 |
| 3. Hydrolyse mit Dowex 50                                  | 36 |
| 4. Entsalzen mit Dowex 50                                  | 37 |
| Dowex 50                                                   | 37 |
| Vorbehandlung                                              | 37 |
| Arbeitsbedingungen                                         | 37 |
| Austauschermenge                                           | 38 |
| Die Austauschersäule                                       | 38 |
| Einbringen der Substratlösung                              | 38 |
| Wirkung des Austauschers                                   | 38 |
| Die chromatographische Apparatur                           | 39 |
| Testlösungen                                               | 40 |
| Beschreibung der angewandten Methode                       | 40 |
| Ergebnisse                                                 | 42 |

|                 |    |
|-----------------|----|
| ZUSAMMENFASSUNG | 43 |
|-----------------|----|

|           |    |
|-----------|----|
| LITERATUR | 48 |
|-----------|----|

## EINLEITUNG

Seit es in den letzten Jahren gelungen ist, die im Blutserum enthaltenen gebundenen Eiweisszucker qualitativ und quantitativ genauer zu bestimmen, gewonnen diese auch für die Klinik zunehmendes Interesse.

Es war lange Zeit unbekannt, dass neben der Glukose noch weitere Zucker im Blutserum enthalten sind. E. Freund wurde als erster auf sie aufmerksam, als er im Jahre 1885 eine Säurehydrolyse an Serumeiweisskörpern von Karzinomkranken vornahm. Dabei bemerkte er, dass nach der Hydrolyse die Substratlösungen mehr reduzierende Substanzen enthielten als die entsprechenden unhydrolysierten Lösungen. Seine Versuchsergebnisse wurden in der folgenden Zeit durch Arbeiten anderer Autoren bestätigt.

So fand Mörner (1893) am Proteid des Säugerserums reduktionswirksame funktionelle Gruppen, die er als Aldehydgruppen charakterisierte (69).

Die Ergebnisse der Arbeiten über die eiweissgebundenen Kohlenhydrate bis etwa zum Jahre 1930 waren im Grossen und Ganzen noch nicht befriedigend, da man bis dahin über keine zureichende Technik auf diesem Gebiete verfügte.

Lustig und Langer beschäftigten sich eingehend mit den Zuckern der Eiweisskörper (1931). Sie führten Hexosebestimmungen nach der Orcinmethodik von Tillmanns und Philippi (1929) durch und verglichen die Farbreaktionen mit denen der Glukose. Dabei kamen sie zu einem Hexosenwert des Blutserums von 90 - 150 mg%.

Bei Pneumonien, exsudativer Tuberkulose und Karzinomen fanden sie einen Anstieg bis über 350 mg%. Nilsson (1937) bestimmte das Glukosamin der Serumeiweisskörper nach der Methode von Elson und Morgan (1933) und fand bei Pneumonien erhöhte Werte. In den späteren Jahren befassten sich zahlreiche Autoren mit den eiweissgebundenen Kohlenhydraten und mit ihrer Vermehrung bei zahlreichen Erkrankungen: Blix, Bergstermann, Edsall, Greenspan, Grevenstuck, Gutman, Meyer, K., Schultze H. E., Stary u. a. (Einen Literaturüberblick gibt Bergstermann (6)).

### Einteilung der kohlenhydrathaltigen Eiweisskörper

K. Meyer (1945) definierte als Glykoproteide Eiweisskörper mit einem Kohlenhydratanteil von über 5 %. Im Gegensatz zu den Nukleoproteiden entstehen bei ihrer Aufspaltung keine Purine. Als Untergruppe trennte derselbe Autor die Mucoide oder Mucoproteide ab, die bei hohem Kohlenhydratgehalt

mehr als 4 % Hexosamine aufweisen. Den Kohlenhydratanteil konnte ein saures oder neutrales Mucopolysaccharid bilden. Saure Mucopolysaccharide sind charakterisiert durch ihren Gehalt an Uronsäuren und Schwefelsäure und kommen hauptsächlich in der Grundsubstanz des Bindegewebes vor. Die neutralen Mucopolysaccharide enthalten überwiegend neutrale Zucker und bilden einen grossen Teil der Zuckerkomponenten am Serumeiweisskörper.

Die von Meyer gegebene Einteilung war aber nicht klar genug, um eine eindeutige Nomenklatur zu schaffen. Vor allem war der Unterschied im Aufbau der sauren und neutralen Mucopolysaccharide zu gross, um sie in einer Gruppe zu erfassen.

Südhof und Kellner schlugen vor, die Glykoproteide mit überwiegendem Proteincharakter Oligoglykoproteine zu nennen und von ihnen die Polyglykoproteine zu trennen, bei denen die Kohlenhydratkomponente ihren Charakter bestimmt (82).

H. E. Schultze grenzte Glykoproteine und eiweisshaltige Mucopolysaccharide von einander ab (85). Er legte dafür unser heutiges Wissen über den Aufbau und das chemische Verhalten dieser Stoffgruppen zu Grunde.

Glykoproteine stellen einen Konstitutionstypus dar aus mehreren Glykopolyptidketten konstanter Aminosäure- und Zuckerzusammensetzung. Zwischen Zucker und Eiweiss besteht eine Kovalenzbindung. Die Festigkeit dieser Bindung gegenüber hydrolytischen Einflüssen ist grösser als die der Peptidbindung (85). Glykoproteine enthalten hauptsächlich neutrale Zucker. Der Zuckeranteil kann mehr oder weniger gross sein. Ein Überwiegen des Proteincharakters kommt in der Fällbarkeit mit Trichloressigsäure zum Ausdruck. Für Glykopolyptide und Glykoproteine, die wegen ihres hohen Kohlenhydratgehaltes nicht mehr die charakteristische Fällbarkeit der Proteine mit Trichloressigsäure zeigen, schlug Schultze vor, die schon von manchen Autoren gewählte Bezeichnung Mucoide beizubehalten (85).

Beiden eiweisshaltigen Mucopolysacchariden (auch Mucoproteine oder einfach Mucopolysaccharide genannt) sind Eiweiss und Zucker ionenartig gebunden. Diese Bindung besteht zwischen der Aminogruppe des Proteins und einer Uronsäure- oder Schwefelsäuregruppe des Zuckers (Haurowitz 1936 (40)). Sie ist pH- und konzentrationsabhängig. Die Mucoproteine enthalten keine neutralen Zucker und als kennzeichnenden Bestandteil Uronsäuren. Mit Trichloressigsäure kommt keine Fällung zustande. In diese Gruppe gehören die Eiweisskörper, die mit einem hohen Anteil an Hyaluronsäure, Chondroitin- oder Mucoitinschwefelsäure verbunden sind. Haurowitz wählte für sie die Bezeichnung Mucoproteine (40).

Wir haben uns im folgenden an diese Einteilung gehalten. Glykoproteinen, Mucoproteinen und Mucoiden gemeinsam ist ihre grössere Wasserlöslichkeit gegenüber

Proteinen. Die schwer fällbaren Mucoproteine und Mucoide übertreffen darin noch die Glykoproteine. Im Vergleich zu den Proteinen zeigen Glykoproteide eine höhere Thermostabilität. Die einzelnen bisher bekannten Kohlenhydratbausteine der Eiweisskörper werden unten angeführt. Die enthaltenen Hexosamine liegen in der Regel als Azetylverbindungen vor.

# KOHLENHYDRATBAUSTEINE IN MENSCHLICHEN UND TIERISCHEN PROTEIN-KOHLENHYDRATVERBINDUNGEN (nach Schultze (85))

D- Mannose

D- Galaktose

D- Glukose (selten)

D- Xylose (selten)

L- Fukose

N- Azetyl-D-Glukosamin

N-Azetyl- D-Galaktosamin

Sialinsäure (in Form von Azetyl-, Diazetyl- oder Glykoly-Neuraminsäure)

Hyaluronsäure (N-Azetyl-D-Glukosamin + D- Glukuronsäure)

Chondroitinschwefelsäure (Schwefelsäureester von N-Azetyl-D-Galaktosamin +  
D-Glukuronsäure)

Mucoitinschwefelsäure, Heparin (Schwefelsäureester von D- Glukosamin +  
D- Glukuronsäure)

Die Mucoproteine mit ihrem Gehalt an Uronsäuren bilden den Hauptteil der Binde- und Stützgewebsgrundsubstanz des menschlichen und tierischen Organismus. Man findet sie in der Samen- und Synovialflüssigkeit, an den Herzklappen, an der Nabelschnur, am Glaskörper und in der Haut. Die Untersuchung der Mucoproteine lenkte die Aufmerksamkeit auf die besondere Bedeutung der Glykoproteide für wichtige Stoffwechselvorgänge im Organismus. Normalerweise sind sie im Blut nur in geringer Menge vorhanden. Doch kommt es unter pathologischen Bedingungen z.B. bei Sarkomen und Neuroblastomen zu einer Anreicherung von Mucopolysacchariden im Blut. (Deutsch (26)).

Mucoide findet man im Serum, im Harn, im Eiklar und in den Muzinen. Die Blutgruppensubstanzen enthalten als spezifisch wirksame Komponenten Polysaccharide. Als Mucoide ist ihr Antigenvermögen nur gering. Doch sind sie Haptene von grosser Wirksamkeit. Ihr Polysaccharidanteil enthält relativ viel Fukose und hemmt die Isoagglutination der Erythrozyten. Das Seromucoid (Orosomucoid) mit einem Kohlenhydratgehalt von fast 40 % gehört der  $\alpha_1$ -Fraktion der Serumeiweisskörper zu. Es wurde von Winzler erstmals isoliert (102, 103) und bei einem Molekulargewicht von 4100 - 4400 als niedermolekulares Säureprotein bezeichnet.

Die Muzine, die in Schleimen und anderen Drüsensekreten vorkommen, stehen den Mucoiden nahe. Ihr Gehalt an Mannose ist nur gering (Blix, Werner und Odin).

Bei den Glykoproteinen interessieren hier vor allem die des Blutserums.

Die Glykoproteine enthalten meist mehrere Zucker als prosthetische Gruppe (Oligo- oder Polysaccharide). Masamune wies für die Blutgruppensubstanz, die er aus Schweinemagen gewann, Azetylglukosamin als konstanten, Hexosen und Fukose als variablen Zuckeranteil nach (63). Möglicherweise liegen bei den anderen Glykoproteinen ähnliche Verhältnisse vor. Sialinsäuren sind die einzigen sauren Zuckerkomponenten der Glykoproteine. Nach Blix, Gottschalk und Klenk fasst man sie als Derivate der Neuraminsäure auf (10). Sie werden bei der Hydrolyse zuerst frei. Durch alkalische Hydrolyse lassen sich die Polysaccharide vom Eiweiss isolieren. Bei saurer Hydrolyse werden die Polysaccharide in die einzelnen Zuckerbausteine zerlegt. Dabei wird Galaktose leichter als Mannose und Hexosamine in Freiheit gesetzt (Werner und Odin (98)). Masamune, der sich - wie oben erwähnt - ebenfalls mit den einzelnen Zuckerbausteinen befasste, kam auf Grund seiner Arbeiten zu dem Ergebnis, dass die Eiweiss-Zuckerbindung über die Aminozucker erfolgen müsse (63).

Typische Glykoproteine des Blutserums sind Thrombin, Prothrombin,  $\alpha_2$ -Makroglobulin, Coeruloplasmin, Fibrinogen.

#### Gewinnung kohlenhydratreicher Eiweisskörper aus dem Blutserum

Die Bestimmung der gebundenen Kohlenhydrate des Blutserums erwies sich in den letzten Jahren für die Klinik von zunehmender Bedeutung. Eine Erfassung der Gesamtmenge an Kohlenhydrat gibt hier schon gewisse Anhaltspunkte über pathologische Schwankungen.

Weiteres Interesse verdienen die Gehaltsverschiebungen einzelner definierter Proteinindividuen. Die Gewinnung kohlenhydratreicher Eiweissfraktionen gelang auf dem Wege der Aussalzung, Fällung und mit Hilfe der Elektrophorese. Von den vielen auf verschiedene Weise gewonnenen Fraktionen seien nur einige hier kurz erwähnt.

Bekannt wurden die Untersuchungen von Hewitt, der aus Pferdealbumin Sero-glykoid und Globoglykoid gewann (1947).

Rimington, Hewitt und van der Ende isolierten einen Körper, den sie als Seromucoid bezeichneten und der dem oben erwähnten Globoglykoid nahesteht.

Winzler und Mitarbeiter gewannen aus menschlichem Serum das Seromucoid und untersuchten seine Zuckerkomponenten insbesondere auch unter pathologischen Bedingungen (102, 103).

Polonovsky und Jayle (1938) entdeckten einen Eiweisskörper, der die Peroxydase-eigenschaften des Hämoglobins verändert und als Haptoglobin bezeichnet

wurde. Er wandert im Elektrophoresediagramm mit den  $\alpha_2$ -Globulinen. Eine  $\alpha_2$ -Vermehrung soll vorwiegend durch Zunahme an Haptoglobin verursacht werden. (Vgl. auch Burtin (17)).

Die mit Hilfe der Vertikalelektrophorese (Grassmann und Hannig 1948) mögliche Auftrennung der Serumeiweisskörper schuf neue Wege zur Charakterisierung der einzelnen auf diese Weise gewonnenen Proteidfraktionen auch in Bezug auf ihren Kohlenhydratgehalt. Blix, Tiselius und Svenson bestimmten das Glukosamin und die Hexosen der Globuline (11).

Bergstermann fand einen Hexosengehalt der Albumine von etwa 0,4 %, der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline von 4 - 5 % und der  $\gamma$ -Globuline von 1,5 - 2 % (6).

Grönwall und Mitarbeiter entwickelten eine Methode des Nachweises von Glykoproteiden mit Hilfe der PAS-Reaktion.

Sie fanden, dass in den  $\alpha$ -Globulinen die grössten Anteile von proteingebundenen Zuckern lokalisiert sind (57).

### Die Zucker des Blutserums

Die Identifizierung der einzelnen Zucker des Blutserums stand im Mittelpunkt vieler Arbeiten der letzten Jahre. Dabei traten die chemischen Bestimmungen zunächst in den Vordergrund und wurden erweitert durch chromatographische insbesondere papierchromatographische Verfahren.

Nach den bisherigen Untersuchungen liegen die Serumzucker in drei Formen vor. Frei im Serum gelöst ist Glukose und Fruktose (95) sowie Laktose in kleinen Mengen (3).

Die Oligo- und Polysaccharide kommen als freie oder nur locker gebundene Körper vor und vor allem als stabile Komponenten der Glykoproteide. Ihre im Einzelnen zu berücksichtigenden Bausteine sind folgende (86): D- Mannose, D- Galaktose, L- Fukose, N- Azetylglukosamin, N- Azetylgalaktosamin, Neuraminsäure bzw. Sialinsäuren und Hexuronsäure.

Am längsten bekannt sind die Hexosamine, vor allem das Glukosamin (Langstein 1901/02 (58), Zanetti 1903 (104), Neuberg 1901 (72)) und die beiden Hexosen Mannose (Dische 1928 (27)) und Galaktose (Bierry 1930 (8)).

Sary wies im Serum kleine Mengen von Hexuronsäuren nach und bestimmte ihren Anteil am Serumprotein mit 0,12 - 0,14 % (87) (vgl. auch Badin (1)).

Odin und Werner fanden 1952/55 eine organische Säure, die sie als Sialinsäure bezeichneten und die nach Klenk und Faillard (1954) mit Neuraminsäure identisch ist. Sie wird charakterisiert durch ihre Farbreaktion mit dem Bialschen und Ehrlich-schen Reagenz. Neuraminsäure hat stark sauren Charakter und bildet farblose Kri-

stalle. Sie ist sehr säureempfindlich und neigt unter gegebenen Bedingungen zu Huminkörperbildung. Zu den Kohlenhydraten besteht insofern eine nahe Beziehung als die Neuraminsäure zur Glykosidbildung befähigte Carbonylgruppen enthält.

Fukose wurde von Springer (1955) als Polysaccharidanteil der blutgruppenspezifischen Substanzen beschrieben (vgl. Dische und Jacubeit (28)).

Den Nachweis über das Vorkommen von Galaktosamin im Serum erbrachten Werner (97) und Goa (37) in den Jahren 1951 und 1955.

Für die quantitativen chemischen Bestimmungen dieser Zucker sind zahlreiche gute Methoden ausgearbeitet worden.

Im Folgenden seien Werte aus den Normalbereichen unserer Bestimmungen wiedergegeben.

|                  |               |                     |
|------------------|---------------|---------------------|
| 1. Hexosen       | 100 - 120 mg% | (bezogen auf Serum) |
| 2. Hexosamine    | 80 - 90 mg%   | "                   |
| 3. Fukose        | 8 - 9,5 mg%   | "                   |
| 4. Neuraminsäure | 50 - 60 mg%   | "                   |

Angewandte Methoden:

1. In Anlehnung an die Methode von Haugaard und Sorensen.
2. Nach Elson und Morgan.
3. Nach Dische und Shettles.
4. Nach Böhm, Dauber, Baumeister, in Anlehnung an Klenk und Langerbeins.

#### Veränderungen des Polysaccharidgehaltes im Serum bei verschiedenen Erkrankungen

Schon aus Untersuchungen, die Ende des vorigen Jahrhunderts durchgeführt wurden, geht hervor, dass bei bösartigen Geschwülsten und entzündlichen Erkrankungen der Gehalt des Serums an eiweissgebundenen Kohlenhydraten zunimmt. Diese Vermehrung der Kohlenhydrate betrifft vor allem die  $\alpha$ -Fraktionen, die fast nur aus zuckerhaltigen Eiweisskörpern bestehen. Nach neueren Untersuchungen steht sie in Beziehung zur Verkürzung des Weltmann'schen Koagulationsbandes (Bergstermann(5)). Der Anstieg der Polysaccharide erhöht die Hitzekoagulationsschwelle der Serum-eiweisskörper. Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Erscheinung um einen Faktor der Abwehr im Organismus.

Eine starke Vermehrung der gebundenen Kohlenhydrate findet man bei fortgeschrittenen Karzinomen, vor allem wenn starker Gewebszerfall vorliegt und ausgedehnte Knochenmetastasen vorhanden sind (Hexosen bis 350 mg%). Extreme Erhöhungen treten auch bei Pneumonien und exsudativen Pleuritiden auf.

Bei Tuberkulose entspricht der Gehalt des Serums an Glykoproteiden der Aktivität des Prozesses. Sehr akute und prognostisch ungünstig erscheinende Erkrankungen haben die höchsten Polysaccharidwerte. Dabei charakterisiert ein erhöhter Prozentteil von Polysacchariden am Eiweisskörper das Krankheitsbild besser wie der Gesamtanstieg der Glykoproteide im Serum (5, 6). Eine Bewertung des Polysaccharidgehaltes im Hinblick auf das Krankheitsgeschehen kann über die Schwere einer Erkrankung mehr Aufschluss geben als über ihre Art.

Beobachtungen bei Lebererkrankungen zeigen, dass bei akuten Erkrankungen erhöhte Polysaccharidwerte vorliegen. Bei der Leberzirrhose sind die gebundenen Zucker normal oder erniedrigt. Schwer verlaufende akute Hepatitiden weisen einen starken Abfall der Polysaccharidwerte auf. Man kann daraus schliessen, dass die Bildung der Zuckereiweisskörper mit dem Leberstoffwechsel im Zusammenhang steht.

Nephritiden haben eine mässige Erhöhung der Polysaccharide, der nephrotische Symptomkomplex relativ hohe Werte bei niedrigem Glykoproteidgehalt. Die niedermolekularen Eiweisskörper werden wie die Albumine vermehrt mit dem Urin ausgeschieden (Bergstermann (6)).

Untersuchungen bei weiteren Krankheitsbildern ergaben ebenfalls einen Anstieg der gebundenen Zucker: Myocardinfarkt, rheumatische Arthritis, Entzündungen, Verbrennungen, Arteriosklerose, hämorrhagische Diathesen, maligne Granulome, Leukämien, Infektionskrankheiten, Allergosen, Lupus erythematosus disseminatus, Hyperthyreose, Diabetes mellitus, Myelome (in den  $\gamma$ - und  $\beta$ -Fraktionen), Makroglobulinämie Waldenström (in den pathologischen Papaproteinen). Bei manchen Erkrankungen lässt sich im Verlauf eine Verschiebung der Polysaccharidvermehrung von den schnell wandernden zu den langsam wandernden Eiweissfraktionen verfolgen (Lebererkrankungen, Infektionskrankheiten).

Die Bedeutung der Zunahme der Polysaccharide im pathologischen Geschehen ist noch nicht genau bekannt. Sie geht der Bildung von Antikörpern voraus. Je weniger Abwehrkräfte dem Organismus zur Verfügung stehen, am Beginn einer Krankheit oder wenn die Abwehrmechanismen versagen, desto mehr betrifft die Polysaccharidvermehrung die leichter löslichen Fraktionen (Bergstermann (5)).

Allgemein lässt sich sagen, dass die gebundenen Serumzucker zunehmen, wenn der Eiweisstoffwechsel stärker in Anspruch genommen ist. Dies trifft neben Erkrankungen (Infektionen, Geschwülsten, Traumen) auch für die Gravidität und das Wachstum zu.

Es soll die Aufgabe dieser Arbeit sein, zur Klärung von Fragen auf diesem Gebiete mitzuhelfen und neben die Bedeutung der chemischen Bestimmungen gebundener

Eiweisszucker die Bedeutung der Chromatographie insbesondere der Papierchromatographie für diese Probleme zu stellen. Der Vorzug der letztgenannten Methode liegt darin, dass die Zucker nicht nur durch die ihnen eigene Reaktionsfähigkeit bestimmt, sondern auch selbst in reiner Form gewonnen werden können. Die gleichzeitige Anwendung beider Verfahren bietet eine sichere Grundlage für die Analyse von gebundenen Eiweisszuckern.

## DIE ANALYSE VON ZUCKERBAUSTEINEN DURCH DIE CHROMATOGRAPHIE

### Die Entwicklung der Chromatographie

Zum Verständnis der Chromatographie seien hier einige kurze Hinweise auf die Geschichte ihrer Entwicklung und ihr Wesen vorausgeschickt.

Die Chromatographie umfasst alle Vorgänge, bei denen aus Mischungen verschiedener Substanzen die einzelnen oder einige Komponenten auf dem Wege der Kapillaranalyse, der Adsorption, der Verteilung oder des Austausches abgetrennt werden können. Ihre Wurzeln gehen wohl zeitlich weiter zurück als wir wissen, da sie einfachen Beobachtungen des Naturgeschehens entspringen.

Die ersten Berichte über eine Art Papierchromatographie mit praktischer Anwendung haben wir von Plinius. Er beschrieb die Durchtränkung von papyri mit Gallapfelextrakten, die der Gewinnung von Eisensulfat diene. Aus der Geschichte der frühen Chromatographie sind uns folgende Namen bekannt: Runge (1822, 1855) als Entdecker der Kapillaranalyse, Schönbein (1861), E. Fischer (1892) und Goppelsröder (1902). Bei den meisten der frühen Versuche wurde die zu untersuchende Lösung ins Papier aufgesaugt.

Die Adsorptionschromatographie, die auf Tswett (1903) zurückgeht, benützt bestimmte Stoffe (wie Kalziumkarbonat und Aluminiumoxyd), die die Eigenschaft haben andere Substanzen festzuhalten. Man verwendet das Adsorbens in Form einer Säule und bringt das Untersuchungsmaterial am oberen Ende auf. Ein Lösungsmittel wäscht die einzelnen Substanzen heraus und verteilt sie auf verschiedene Zonen der Säule. Die ersten Anwendungen erfolgten an Pflanzenfarbstoffen.

Zur Trennung farbloser Substanzen an der Säule wusch Reichstein (1938) die einzelnen Komponenten mit verschiedenen Lösungsmitteln heraus (Flowing Chromatogramm).

Martin, Gordon und Synge (1944) entwickelten die Verteilungschromatographie. Die Grundlage ihrer Arbeiten ist die Eigenschaft löslicher Stoffe, sich in zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten in bestimmtem Verhältnis zu verteilen (Nernst). Sie benützten eine Silicagelsäule, die mit Wasser getränkt wurde, als unbewegliche und ein organisches Lösungsmittel als bewegliche Phase. Zwischen den beiden Phasen verteilten sich die Substanzen nach ihrer Löslichkeit in Wasser und in der angewandten organischen Lösung.

Die von Consden, Martin und Gordon (1944) eingeführte Papierchromatographie kann ebenfalls als Verteilungsvorgang gedeutet werden, bei dem sich Substanzen nach ihren physikalischen Eigenschaften in einer wässrigen und einer organischen Phase verschieden anreichern. Die ersten papierchromatographischen Tren-

nungen wurden an Aminosäuregemischen vollzogen. Weitere Anwendung fand das Verfahren auf Zuckergemische, Naturfarbstoffe, Phenole, Purine, organische Säuren, Steroide und andere Stoffe.

Zu erwähnen wäre noch die Chromatographie am Ionenaustauscher (Boyd, Spedding, Tompkins 1947).

Mit Hilfe der Chromatographie lassen sich Stoffe trennen, die chemisch verwandt sind und einer anderen Trennung schwer oder überhaupt nicht zugänglich. Das Variieren von Adsorbentien und Lösungsmitteln, in der Papierchromatographie von organischer und wässriger Phase des Lösungsmittels gibt weite Möglichkeiten der Trennung. Die Papierchromatographie erlaubt zudem die Isolierung von sehr kleinen Mengen (bis einige  $\gamma$ s).

## Chromatographie der Zucker

Die verschiedenen oben angeführten Methoden lassen sich auch auf Zuckergemische anwenden (9, 12, 21, 25, 60, 61).

### 1. Trennung an der Säule.

Eine der erstangewandten Methoden war die Adsorption von Zuckern an verschiedene Trägerstoffe (Reich (80), Colemann (20), Colemann und Mc Closkey (19), Mertzweiler (68), Hurd und Zelinski (49) in den Jahren 1939 - 1947).

Aus verschiedenen Zuckern liessen sich Ester mit Azoverbindungen herstellen, die man an Silicagel- oder Aluminiumsäulen adsorbieren liess. Die gefärbten Zonen wurden mechanisch getrennt und die Ester mit Methanol, Chloroform oder anderen Lösungsmitteln eluiert (Glukose, Fruktose u. a.).

Andere Zuckerester konnten an hydriertem Magnesiumsilikat (Magnesol) oder Kieselsäure getrennt werden. Methylierte Zucker liessen sich auch an Aluminiumsäulen adsorbieren. Die Lage der Zonen ergab die Fluoreszenz im ultravioletten Licht (Jones (53), Norberg (73), Boissonas (14)).

Die Trennung azetylierter Zucker gelang an Magnesol- und Aluminiumsäulen. Der Nachweis der Zonen erfolgte mit alkalischer Permanganatlösung (Talley (89), Mc Neely (71), Binkley und Wolfrom (9)). Binkley und Wolfrom beschäftigten sich auch mit dem Einfluss der funktionellen Gruppen auf das chromatographische Verhalten azetylierter Zucker.

Andere Autoren trennten Phenyllosazone von Zuckern (Fischer - Jorgensen (31)), Zuckerboratkomplexe (Khym (54)) und freie Zucker. Als Adsorbentien dienten: Kalziumkarbonat, Dowex 1, aktive Erden (Flores 30), Silen E.F., Kohle und As-

best. Lösungsmittel waren: Alkohol, Äther, Dioxan, Ketone, Säuren, Pyridin, Wasser und Ephedrin. Die Entdeckung der Zonen war mit alkalischem Permanganat, pH-Indikatoren, 2, 6-Dichlorophenol, Indophenol und polarimetrisch möglich.

Zahl und Lage der funktionellen Gruppen bestimmen die Reihenfolge der Komponenten am Adsorbens. Polysaccharide wie Amylose, Glykogen, Polymere der Zellulose wurden an Baumwolle, Kalziumkarbonat, Silen E.F. oder Magnesol adsorbiert. Die Lage der Polysaccharide hängt vom Molekulargewicht ab.

## 2. Verteilungschromatographie.

Die erste Anwendung der Verteilungschromatographie auf Zucker veröffentlichte Bell 1944 (4). Er trennte methylierte Zucker mit Chloroform und Butanol an Silica-gelsäulen. Auch gepulverte Zellulose erwies sich für einfache Zucker als unbewegliche Phase brauchbar. Aus ihr wurden die Zucker mit wassergesättigtem n-Butanol/Ammoniak ausgewaschen und die Eluate im Fraktionskollektor aufgefangen. Der qualitative Nachweis der einzelnen Portionen erfolgte am Papierstreifen (Hough, Jones und Wadman (47)). Auch dieses Verfahren wurde in zahlreichen Arbeiten für verschiedene Verwendungsgebiete ausgebaut.

## 3. Papierchromatographie der Zucker.

Die guten Ergebnisse, die auf dem Gebiet der Eiweissbausteinanalyse mit Hilfe der Papierchromatographie seit den ersten Veröffentlichungen von Consden, Gordon und Martin (1944) erzielt worden waren, legten den Gedanken nahe, diese Methode auch zur Trennung von Zuckern zu benützen.

Die ersten Arbeiten führte Partridge aus (1946/1947) (75). Er benützte eine ähnliche Apperatur und dieselben Lösungsmittel wie Consden, Gordon und Martin und beschrieb das Wesentliche der Methode folgendermassen: Eine kleine Menge der zu analysierenden Substanz wird als kreisrunder Fleck nahe am Ende eines Filterpapierstreifens aufgetragen. Das Papier taucht man mit diesem Ende in einen Trog, der mit Lösungsmittel gefüllt ist, und von dem es vertikal nach unten hängt. Trog und Papierstreifen befinden sich in einem verschlossenen Gefäss, dessen Atmosphäre mit Lösungsmittel- und Wasserdampf gesättigt ist. Das Lösungsmittel wandert entsprechend den physikalischen Gegebenheiten mit horizontaler Front abwärts. Die Durchfeuchtung eines 35 cm langen Streifens dauert etwa 18 - 24 Stunden. Danach wird der Streifen getrocknet und die neue Lage der Komponenten der Lösung auf dem Papier durch ein geeignetes Sprühreagenz sichtbar gemacht.

Partridge beschreibt diesen Vorgang als eine Verteilung der Substanz zwischen dem von der Zellulose gebundenen Wasser und dem Lösungsmittel, das über die Oberfläche der Papierfasern fliesst (75). Die Entfernung, die die gelöste Substanz zurücklegt, ist abhängig vom Verteilungsquotienten der Substanz zwischen Wasser und wassergesättigtem Lösungsmittel, von der Wassermenge, die an der Flächeneinheit

des Papiere gebunden ist und von der Lösungsmittelmenge, die an der Flächeneinheit des Papiere festgehalten wird. Die beiden letztgenannten Faktoren sind gleich, wenn man stets mit demselben Papier arbeitet, das einheitlich in seiner Faserstruktur, Dicke und in seinem Wassergehalt ist. Die relative Entfernung, die eine gelöste Substanz zurücklegt, ist unter diesen Umständen nur vom Verteilungsquotienten abhängig. Es lässt sich für jede gelöste Substanz ein seine Wanderungsgeschwindigkeit charakterisierender Wert errechnen, der als "Retardation to Front" (RF) bezeichnet wird und nach Consden (1944) folgende Definition hat:

$$RF = \frac{\text{Von der Substanz zurückgelegte Entfernung:}}{\text{Von der Lösungsmittelfront zurückgelegte Entfernung.}}$$

Nach experimentellen Untersuchungen von Consden und Martin besteht eine enge Beziehung des RF - Wertes zum Verteilungsquotienten. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass es sich bei diesem Vorgang um eine Verteilung handelt und die Zellulose als Adsorbens nur eine geringe Rolle spielt.

P. Decker und W. Riffart (1950, (24)) halten die Papierchromatographie für einen reinen Adsorptionsvorgang, bei dem die Sättigungskonzentration des Papiere nicht erreicht wird, sodass Adsorption nur im linearen Bereich der Langmuirschen Isothermen stattfindet.

Für die Deutung der Papierchromatographie wesentlich ist, dass auch die einphasigen Lösungsmittel eines Wasserzusatzes von mindestens 5 % bedürfen, damit ein befriedigendes Trennungsergebnis erreicht wird. Die kristallinen Polysaccharide der Papierzellulose neigen zur Quellung mit Wasser. Diese gequollene Form der Zellulose stellt die chromatographisch wirksame wässrige Phase dar, in der sich die hydrophilen Molekeln lösen und ins Gleichgewicht mit der vorbeiströmenden feuchten organischen Phase setzen. Bei Stoffen jedoch, die zur Wasserstoffbrückenbindung neigen, ist auch ein Adsorptionsvorgang nicht auszuschliessen.

Neben einfachen Zuckern wurden bald auch methylierte Zucker papierchromatographisch dargestellt (Hough (47), Brown (15)).

### Methodik der Zuckerchromatographie

Die Papierchromatographie stellt auch für Zucker ein Analysenverfahren dar, das mit einfachen Mitteln ausgeführt werden kann.

#### Substanz.

Die Substanz, die untersucht werden soll, ist im Allgemeinen eine wässrige Zuckerlösung. Daneben können auch Lösungen in Azeton, Benzol, Alkohol und Pyridin verwendet werden, die man vor Beginn der Chromatographie wetrocknet. Jede Komponente der Zuckerlösung soll 1/2 bis 1 %ig in der Lösung vorliegen

und etwa 50 - 100 Gamma jeder Substanz auf das Papier aufgetragen werden. Wenn man zu viel aufbringt wird das Verteilungsgleichgewicht gestört, indem die polare Phase nicht mehr imstande ist, die ganze Substanzmenge zu lösen. Die Flecke werden unscharf (Schwanzbildung). Die untere Nachweisbarkeitsgrenze liegt bei Zuckern im Bereich einiger Gammas. Zur genauen Bestimmung von Rf-Werten ist es gut nur etwa 30 Gamma aufzutragen. Dadurch erhält man kleinere, scharfe Flecke. Liegen Lösungen vor mit zu geringem Zuckergehalt, so engt man sie im Gefriervakuum ein oder lässt die Flüssigkeit im Luftstrom verdampfen. Letzteres wird später beschrieben (St. 50).

### Auftragen der Substanzlösung.

Zum Auftragen der Substanzlösung benützt man am besten eine Mikropipette (Blutzucker-, Elektrophoresepipette oder Spezialpipette "Agla", mit der noch Einheiten bis zu  $1 \text{ mm}^3$  gemessen werden können. Die Substanzlösung wird meist punktförmig 6 - 8 cm vom Papierrand aufgetragen, mehrere Substanzen nebeneinander im Abstand von 1,5 - 3 cm. Die Lösung soll auf möglichst kleiner Fläche aufgebracht werden, da die Flecke beim Wandern diffuser werden und deshalb an Schärfe verlieren. Man achtet daher beim Aufbringen auf's Papier, dass der Durchmesser der Startflecke nicht grösser als etwa 2 cm wird. Wenn man mit einem Warmlufttrockner immer wieder das Lösungsmittel verdampfen lässt, kann die Substanz sehr rasch aufgetragen werden.

### Störende Stoffe.

Manche Lösungen enthalten Fremdstoffe, die die Chromatographie stören können. Dies gilt besonders für anorganische Salze und Ionen, wenn sie in grösserer Konzentration vorliegen. Die Ionen ziehen als hydrophile Teilchen Wasser an und stören so das Wassergleichgewicht der Phasen. Zur Entionisierung wurden vor allem drei Verfahren angewendet.

1. Mit Schwefelsäure hydrolysierte Polysaccharidlösung wird mit Bariumhydroxyd versetzt und das ausgefällte Bariumsulfat abfiltriert.

Auch andere geeignete Fällungsmittel können verwendet werden. Die Verluste bei diesem Verfahren sind nicht unerheblich.

2. Auch bei der Anwendung von Ionenaustauschern ist zu berücksichtigen, dass die Zucker zum Teil vom Austauscher adsorbiert werden. Dies gilt für Zucker mit freien Aldehydgruppen und Aminosucker. Sowohl an basischen (M. Cramer (22)) als auch an sauren Austauschern wurden Verluste beobachtet.

Aminosucker werden an Kationenaustauschern wie Dowex 50 festgehalten (35).

3. Ein drittes Verfahren ist die Behandlung mit Pyridin, in dem sich die Zucker lösen und Salze ungelöst bleiben.

## Das Papier.

Für die Wahl des Papiere ist es wichtig, dass es in seiner Faserstruktur gleichmässig ist, bestimmte Saugfähigkeit und Dicke hat und keine wasser- oder lösungsmittellöslichen Substanzen, Leime oder Zusatzstoffe enthält. Diesen Bedingungen entsprechen die reinen Linterspapiere weitgehend. Für die Papierchromatographie der Zucker haben sich Whatmannpapier Nr. 1 und die von der Firma Schleicher & Schüll gelieferten Papiere 2043 a und b als besonders geeignet erwiesen. Sie sind frei von Holzzellstoff und harzartigen Substanzen.

Die Papiere enthalten mehr oder weniger austauschaktive Karboxylgruppen, die die Trennung beeinflussen können. Je geringer die Austauschkapazität ist, desto besser lassen sich die einzelnen Komponenten eines Substrates trennen.

Von Jayme und Knolle wird ein Glasfaserpapier empfohlen, dessen Adsorptionsvermögen nur minimal ist. (51).

Für bestimmte Zwecke werden auch vorbehandelte Papiere hergestellt (z.B. mit austauschfähigen Gruppen u. a.).

Die Länge des Papierstreifens zur Chromatographie wählt man zwischen 30 und 60 cm.

## Die Methoden der Papierchromatographie.

1. Bei der absteigenden Methode, die als erste für die Zucker von Partridge (74) angewandt wurde, hängt der Papierstreifen von einem Lösungsmitteltrog nach unten. Sie bietet die beste Möglichkeit, das Lösungsmittel mehrere Tage durchlaufen zu lassen. Der untere Rand des Papierstreifens muss dann mit einer symmetrischen Spitze oder gleichmässigen Zacken versehen sein.
2. Die für die aufsteigende Methode notwendige Apparatur zeichnet sich durch besondere Einfachheit aus. Das vom Deckel der Chromatographiekammer herabhängende Papier saugt das Lösungsmittel von unten nach oben. Hierbei sind grössere Rf-Wertunterschiede notwendig als bei der absteigenden Methode. Denn die Streifen können wegen der abnehmenden Sauggeschwindigkeit nur etwa 30 cm lang sein.
3. Die Trennung einer grösseren Zahl von Zuckern gelang Partridge im zweidimensionalen Verfahren, das absteigend und aufsteigend ausgeführt wird (75). Diese Methode kann deshalb bessere Trennungen erzielen, weil die Zucker nach zwei Richtungen wandern können. Man lässt ein Lösungsmittel durchlaufen, dreht das Papier um 90 Grad und wendet ein zweites Lösungsmittel an.
4. Das Rundfilterchromatogramm wird horizontal in eine runde, flache Kammer gebracht und von der Mitte her nach aussen vom Lösungsmittel durchlaufen. Diese Methode arbeitet sehr rasch und hat einen guten Trenneffekt, der sogar den der

aufsteigenden und absteigenden Methode übertreffen kann (93). Die Substanz wird indem sie nach aussen wandert mehr verdünnt, was die Verteilung zwischen den beiden Phasen begünstigt. Die Ringchromatogramme lassen sich auch quantitativ auswerten. Die Rundfiltermethode wurde von Bersin und Müller beschrieben (7). Nach Venner und Herb hat sie bei Anwendung geeigneter Lösungsmittel eine äusserst verkürzte Laufzeit (45 Minuten bis 2 Stunden). Als Lösungsmittel gaben die beiden Autoren zwei Gemische an:

Butanol/Äthanol/Ammoniak/Wasser (40:10:1:49) und

Butanol/Azeton /Ammoniak/Wasser (40:50:3:15).

Die Grösse der Rundfilter wählten sie mit 12 - 24 cm im Durchmesser (93).

### Apparatur zur Papierchromatographie.

Die Haupteinrichtung zur Papierchromatographie ist eine luftdicht verschliessbare Chromatographiekammer mit Vorrichtungen zum Einbringen des Chromatogramms, die der gewählten Methode entsprechen. Wichtig ist auch die Erhaltung einer konstanten Temperatur mit Hilfe eines Thermoregulators.

### Sättigung der Chromatographiekammer.

Die Papierstreifen mit der zu untersuchenden Substanz sollen 12 - 24 Stunden in einer lösungsmittel- und wasserdampfgesättigten Atmosphäre aufgehängt sein ehe das Lösungsmittel selbst durchläuft. Dadurch vermeidet man, dass sich die Zusammensetzung des Lösungsmittels durch Abdunsten verändert. Eine technische Verbesserung der Apparatur für diesen Zweck war die Anbringung einer kleinen verschliessbaren Öffnung am Deckel der Kammer. Durch sie wurde das Lösungsmittel in den Trog gebracht, ohne dass dabei die Sättigung der Atmosphäre beeinträchtigt wurde (52).

### Die Temperaturkonstanz.

Da sich die Rf-Werte mit der Temperatur ändern (75), sind Temperaturschwankungen zu vermeiden. Beträchtliche Erhöhung der Werte mit zunehmender Temperatur findet man bei Kollidin und Butanol/Äthanol-Gemischen. Phenol zeigt in dieser Hinsicht kaum eine Veränderung. Die meist angewandten Temperaturen liegen zwischen 20 und 26 Grad C. Im schlimmsten Fall kann durch Temperaturschwankung eine Entmischung von Wasser und Lösungsmittel auftreten, wenn die kritische Temperatur des Flüssigkeitsgemisches erreicht wird.

### Lösungsmittel.

Die angewandten Lösungsmittel müssen rein und mit Wasser mischbar sein. Um eine Entmischung von Wasser und Lösungsmittel zu verhindern, ist es gut, beide in einer dem Chromatographieraum entsprechenden Temperatur aufzubewahren.

Als Lösungsmittel für Zucker geeignet sind z.B.:

Phenol/Wasser (900 g Phenol + 100 ml Wasser),

Kollidin/Wasser, beide mit hohen Rf-Werten,

Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) (77),

Äthylazetat/Pyridin/Wasser (2:1:2) und

Äthylazetat/Eisessig/Wasser (3:1:3) (52),

Butanol/Azeton/Wasser/Ammoniak (40:50:3:15) mit rascher Laufzeit (93) und

Butanol/Äthanol/Wasser (4:1:1) sowie zahlreiche andere.

Beim Vergleich von Phenol und Kollidin mit Butanol und Butanol/Äthanol-Mischungen fiel Partridge auf, dass bei Anwendung der letztgenannten Lösungsmittel die Zucker weniger diffundieren. Dies erlaubte auch geringere Zuckermengen aufzutragen und dadurch nahe beieinander liegende Flecke schärfer zu trennen (74). Die Bedeutung des Wasserzusatzes zum Lösungsmittel wurde von Partridge (75) und Jermyn und Isherwood (52) untersucht. Partridge bestimmte die Rf-Werte von Zuckern für verschieden zusammengesetzte Lösungsmittel unter sonst konstanten physikalischen Bedingungen. Dabei stellte er eine Erhöhung der Werte mit zunehmendem Wassergehalt fest. Ein Dreikomponentensystem aus Butanol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 4:1:5 erwies sich für Zucker als besonders geeignet.

Bei ihren Untersuchungen an Polysacchariden von Früchten zeigten sich für Jermyn und Isherwood die bisher bekannten Lösungsmittel zur Trennung von Zuckern als nicht besonders geeignet (52). Sie beschäftigten sich daher eingehend mit dem Einfluss der Zusammensetzung des Lösungsmittels auf den Trenneffekt. Wie auch Partridge, Martin und Syge stellten sie fest, dass der Wassergehalt der organischen Phase des Lösungsmittels die Rf-Werte beeinflusst. Die verschiedenen organischen Lösungsmittel setzen sich unter konstanten physikalischen Bedingungen (Temperatur, Druck) mit verschiedenen Wassermengen ins Gleichgewicht. Lösungsmittel, die mehr Wasser aufnehmen konnten, ergaben höhere Rf-Werte. Dies erwies sich insofern von Bedeutung, als nach den Erfahrungen von Jermyn und Isherwood bei Rf-Werten um 0,2 im Durchlaufchromatogramm die besten Trennergebnisse erzielt werden konnten. Es galt nun die gegebenen Lösungsmittel so zu verändern, dass sie mehr Wasser aufnehmen konnten. Das schon von Partridge, Martin und Syge angegebene Dreikomponentensystem entsprach in seiner Variierbarkeit den gestellten Anforderungen. Wenn man nämlich ein Lösungsmittel benützt, das aus Wasser und zwei organischen Phasen besteht, von denen die eine mit Wasser und dem organischen Lösungsmittel mischbar ist, die andere aber nicht, kann man den Wassergehalt in weiten Grenzen variieren. Er wird von der Menge der mit Wasser mischbaren Phase bestimmt. Damit lassen sich entsprechend die Rf-Werte verändern. Da man das Bestreben hatte, diese in den Bereich um 0,2 zu bringen, war es notwendig an die angewendeten Lösungsmittel die Anforderung einer geringeren Viskosität zu stellen und das rasch laufende Lösungsmittel im Durchlaufchromatogramm am Papier abtropfen zu lassen. Jermyn und Isherwood gaben folgende Ge-

mische als besonders diesen Anforderungen entsprechend an:

Äthylazetat/Eisessig/Wasser (3:1:3) und

Äthylazetat/Pyridin/Wasser (2:1:2).

Bei Phenolen und Kresolen sind die  $R_f$ -Werte höher als dem Wassergehalt des Lösungsmittels entspricht (50).

Lösungsmittelzusätze.

Manche Lösungsmittel werden mit Zusätzen verwendet. Um eine katalytische Oxydation von Phenol oder anderen Lösungsmitteln durch Papierkupfer und sonstige Schwermetalle zu verhindern, gibt man etwas Kaliumcyanid zu. Lösungsmittelgemische mit Butanol und Phenol versetzt man gerne mit einem kleinen Teil Ammoniak, wenn Aminosucker oder saure Substanzen chromatographiert werden sollen. Aus Hexosaminhydrochloriden werden dadurch freie Basen und die Schärfe der Flecke nimmt zu.

### Trocknen der Chromatogramme.

Das Trocknen der Chromatogramme kann an der Luft oder im Trockenschrank erfolgen. Man spannt sie in einen Trockenrahmen ein oder hängt sie senkrecht auf mit dem Startende nach unten. Dabei ist zu vermeiden, dass überschüssiges Lösungsmittel noch über das Papier tropfen kann.

### Nachweis der Zucker.

Manche Zucker zeigen, wenn man den Papierstreifen unter die Analysenquarzlampe legt, Fluoreszenz und lassen sich so nachweisen.

Andere Zucker werden durch Farbreaktion mit geeigneten Reagentien sichtbar gemacht. Diese werden mit einem Zerstäuber auf den Papierbogen gesprüht. Die meisten Farbreaktionen treten bei einer Temperatur um 80 Grad C schnell ein.

Die als Sprays verwendeten Reagentien lassen sich in einige Hauptgruppen einteilen:

Oxydierende Reagentien,  
Amine,  
Phenole und  
Aminophenole.

Zu den oxydierenden Reagentien gehören: Ammoniakalisches Silbernitrat (75), alkalische 3,5-Dinitrosalizylsäure und 3,4-Dinitrobenzoesäure (101), Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC, 94) und Kaliumpermanganat (78). Die Anwendung von Silbernitrat, das zu Silber reduziert wird, war die erste zur Identifizierung von Zuckern auf dem Papierchromatogramm (74).

Die Farbstoffbildung mit Aminen und Phenolen kommt folgendermassen zustande: Die Zucker werden durch Säuren in Furfurolaldehyd oder Derivate des-

selben übergeführt, die mit Aminen und Phenolen sich zu Farbstoffen verbinden.

Verwendete aromatische Amine sind folgende: Anilinhydrogenphthalat (77), Anilinphosphat (16), m-Phenyldiamin (18), p-Amino-dimethylanilin (13), Benzidin (45), Diphenylamintrichlorazetat und Dinitrophenylhydrazin.

Auch andere Amine wie Harnstoff (48), p-Ansidinhydrochlorid (48), p-Ansidinphosphat und p-Aminohippursäure fanden Verwendung.

Phenole wurden schon von Partridge (75) und Forsyt (34) im Jahre 1948 zur Identifizierung von Zuckern benützt. Man wandte sie gerne zusammen mit Trichloressigsäure an, die die Papierzellulose mehr schon als andere Säuren. Von den Phenolen wurden unter anderen folgende gebraucht: Naphtoresorzin,  $\alpha$ -Naphtol, Phlorogluzin (16), Orzinol, Resorzinol (48), Dichlorophenol, Indophenol (100).

Da die Amine besonders mit Aldosen und die Phenole vor allem mit Ketosen reagieren, versuchten Hirax und Mitarbeiter die Wirkungen beider zu kombinieren (42). Sie arbeiteten mit verschiedenen Aminophenolen wie Diaminophenol, Aminophenol, Amino-resorzinol.

Aminoguanidin lässt Ketohexosen weinrot und Aldo-hexosen tiefblau erscheinen (90).

Weiter fanden noch das Anthronreagenz (Dreywood) und Joddampf (Greenway) Anwendung, sowie für Methylpentosen Natriumperjodat und Nitroprussidnatrium und für Aminozucker das Elson-Morgansche Reagenz (Azetylazeton und p-Dimethylaminobenzaldehyd (70, 75)).

Das zur Entwicklung der Chromatogramme verwendete ammoniakalische Silbernitrat erwies sich insofern als ungünstig, als seine Reaktionsbreite für reduzierende Stoffe zu gross war. Westall fand, dass auch andere Substanzen besonders Chlor- und Natriumionen schwarze Flecke auf dem Papier geben (99). Als ein für Zucker mehr spezifisches Reagenz erwies sich Anilinhydrogenphthalat (Anilin 0,93 g, Phthaleinsäure 1,66 g, in 100 ml wassergesättigtem Butanol). Es ist für Aldopen-tosen und -hexosen empfindlich und gibt mit ersteren eine rotbraune und mit den letztgenannten eine braune Farbe (77).

Bei Untersuchungen von Cerebrosiden stiessen Chargaff und Mitarbeiter auf ein Reagenz, das mit Zuckern unter der Quarzlampe fluoreszierende Stoffe bildete. Dieses m-Phenyldiamin wurde von den genannten Autoren auf seine Farbstoffbildung mit verschiedenen Zuckern eingehend geprüft (18).

Horrocks versuchte die Harnzucker papierchromatographisch darzustellen. Er liess Urin in kleinen Mengen aufs Papier tropfen und entwickelte mit Silbernitrat. Mit diesem Reagenz bildeten aber auch die Urate dunkle Flecke. Diesen Nachteil zeigte Benzidin nicht. Es erfasste vor allem Harnzucker wie Glukose, Laktose und Maltose (45, 46).

Der Nachweis von Hexosaminen auf eine bisher neue Weise gelang Stoffyn und Jeanloz 1954 (88). Die beiden Autoren liessen eine 2 %ige Lösung von Ninhydrin in 4 %ig wässrigem Pyridin auf diese Zucker in der Hitze einwirken. Aus den Hexosen Glukosamin und Galaktosamin entstehen dabei die Pentosen Arabinose und Lyxose. Man lässt die Reaktion im zugeschmolzenen Glasröhrchen bei 100 Grad C etwa eine Stunde lang erfolgen. Arabinose und Lyxose lassen sich aus dem Reaktionsgemisch papierchromatographisch nachweisen. (Lösungsmittel: Pyridin/Wasser oder Butanol/Äthanol/Wasser (4:1:1), Spray: Anilinphtalat).

Auch Masamune (65) und Klenk (55, 56) stellten die Aminosucker papierchromatographisch dar.

### Auswertung der Chromatogramme.

Die Bestimmung der Rf-Werte und der Vergleich der Flecke mit gleichzeitig chromatographierten Testsubstanzen ermöglicht die Identifizierung unbekannter Substanzen. Partridge (75), Jermyn und Isherwood (52) berechneten die Rf-Werte für zahlreiche Zucker in mehreren Lösungsmitteln. Da die Rf-Werte von verschiedenen physikalischen Bedingungen abhängig sind, bezog man die ermittelten Werte auch auf einen bestimmten Zucker. Der Wert für diesen Zucker wurde gleich 1 gesetzt (Positionskonstante). Eine einfache Umrechnung ergab dann die Rf-Werte der untersuchten Zucker auch für andere physikalische Bedingungen z.B. für eine andere Temperatur, sofern der Rf-Wert der Bezugssubstanz unter diesen Bedingungen schon bekannt war.

So bezogen Hirst und Mitarbeiter die Rf-Werte von Zuckern auf Tetramethylglukose (43) und erhielten dadurch die RTG-Werte der Zucker.

Quantitative Auswertungen von Chromatogrammen erfolgen auf verschiedene Weise: Durch Bestimmung der Fleckengrösse, Photometrieren des gebildeten Farbstoffes, Eluieren der Farbflecke und colorimetrische Bestimmung oder Auswaschen der Zucker und anschliessende Mikrobestimmung (Somogyi).

Eines der erst entwickelten Verfahren war das von Hirst und Jones, die die entwickelten Zucker aus dem Papier auswaschen ohne sie vorher anzufärben. Dazu müssen sich aber die Rf-Werte der einzelnen Komponenten erheblich unterscheiden (44).

Mc Farren baute die Silbersalzreduktion durch Zucker zur quantitativen Bestimmung aus. Eine gleichmässige Verteilung des Silbernitrats über das ganze Chromatogramm wird dadurch erreicht, dass das Reagenz der auch Pyridin enthaltenden Verteilungsflüssigkeit zugesetzt wird. Die Entwicklung der Flecke erfolgt im Ammoniakdampf. Sie werden colorimetrisch ausgewertet (30).

Auch Wallenfells, Bernt und Limberg erzielten mit der Silbersalzmethode gute Ergebnisse (96).

Die Messung der Silberschwärzung auf dem Papier ist aber ungenauer oder umständlicher als photometrische Verfahren. Durch Mattson und Jensen wurde die reduzierende Wirkung von Zuckern auf Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) bekannt (66). Bei dieser Reaktion entsteht rotes Formazan. Wallenfells wandte sie zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung reduzierender Zucker auf Papierchromatogrammen an. Die Farbflecke können eluiert und ihre Extinktion bestimmt werden. Auf dieser Grundlage baute derselbe Autor eine Mikrobestimmung der Blutzucker auf (96).

Fischer und Dörfel untersuchten eingehend die Faktoren, die die Reaktion der Zucker mit TTC beeinflussen wie Temperatur und Reaktionsdauer. Sie erarbeiteten daraus eine quantitative Bestimmungsmethode mit einer Fehlerbreite von ca 3 % (32).

Zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Glukosamin und Galaktosamin wandten Fischer und Nebel ebenfalls TTC an und erprobten das Verfahren an Hydrolysaten von protein- und polysaccharidhaltigen Stoffen. Die saure Hydrolyse führt nach den beiden Autoren zu Hexosaminverlusten, wenn die Lösungen noch andere Monosaccharide enthalten und ohne Entfernung der Säure eingeeengt werden. Zur Ausfällung von Salzsäure wurde von ihnen Silberkarbonat benützt (33).

Die von Dreywood angegebene Reaktion von Anthron und konzentrierter Schwefelsäure mit Hexosan zu einem blauen Farbstoff wandten Schultz und Gmelin (84) zur Glukose- und Glukosidbestimmung an. Glukoside aus Senföl wurden papierchromatographischen getrennt, eluiert und im Vergleich mit Glukosetestlösung quantitativ bestimmt. Glukose und Glukoside reagieren in einander entsprechender Weise mit dem Anthronreagenz.

Auch die Rundfiltermethode erwies sich für quantitative Arbeiten als brauchbar. Venner und Herb erzielten mit ihr schnelle Ergebnisse. Als Sprühreagenz wandten sie 2,2<sup>4</sup>-(4,4<sup>-</sup>-Stilbenylen) bis (3,5 Diphenyl-3H-tetrazolium-2-chlorid) = STC an. Es hat vor TTC den Vorzug, dass man mit ihm auch im Tageslicht arbeiten kann (92).

### Aufbewahrung der Chromatogramme.

Die Dokumentation der Chromatogramme für wissenschaftliche Veröffentlichungen erfolgt durch photographische Aufnahme im durchfallenden Licht.

Ein Nachdunkeln der Papierstreifen kann man mittels Fixieren verhindern. Grüne empfiehlt, die mit Silbernitrat behandelten Chromatogramme in Natriumthiosulfatlösung einzulegen, die schwach essigsauer gemacht wurde (38). Wallenfells wandte zum Fixieren eine 10 %ige Natriumthiosulfatlösung an (95).

Nach unseren Erfahrungen ist es auch günstig, die mit anderen Sprays behandelten Chromatogramme auf diese Weise zu fixieren.

## Die Struktur der Zucker und ihr Verhalten auf dem Papierchromatogramm

Die Beziehungen von der Konstitution der Zucker zu ihrem Verhalten auf dem Papierchromatogramm aufzudecken, war das Ziel weitgehender Arbeiten von Jermyn und Isherwood (50).

Nach Consden, Gordon und Martin (1944) ändern sich die  $R_f$ -Werte einer homologen Reihe von Aminosäuren mit jeder zusätzlichen Gruppe am Molekül. Martin fand eine lineare Abhängigkeit vom Logarithmus des Verteilungsquotienten einer Substanz zwischen zwei Phasen zu der Zahl der aktiven Gruppen am Molekül (1949). Diese Gruppen können von verschiedener Art sein, doch dürfen sie nicht miteinander interferieren. Ähnliche Verhältnisse liegen wohl auch bei den Zuckern vor.

Das Verhalten der Zucker auf dem Papierchromatogramm hängt von der Leichtigkeit ab, mit der sie in das Wasser der Zellulose und der beweglichen Phase eindringen. Dies wird von Molekülgrösse, Molekülform und der Lage der aktiven Gruppen bestimmt.

Der Einfluss der Konfiguration der Hydroxylgruppen am Molekül wird daraus ersichtlich, dass sich Zucker mit gleicher Zahl von Hydroxylgruppen und gleicher Ringstruktur auf dem Papierchromatogramm trennen lassen, wenn die Konfiguration verschieden ist. Die Form des Moleküls (meist liegt Ringform vor) ist in festem und gelöstem Zustand bei fast allen Zuckern konstant (Cox, Goodwin und Wagstaff 1935). Die  $R_f$ -Werte nehmen mit dem Wassergehalt des Lösungsmittels zu, wofür folgende Beziehung gilt:

$$\log ((1 : R_f) - 1) \propto - \log N$$

( $N$  = Molarer Anteil an Wasser im Lösungsmittel bei 20 Grad C). Veränderungen des Wassergehaltes eines Lösungsmittels führen danach zu keiner anderen Reihenfolge der Zucker.

Diese Beziehungen gelten für Phenole und m-Kresole nicht. Die  $R_f$ -Werte liegen bei ihnen höher als dem Wasseranteil des Lösungsmittels entspricht. Möglicherweise bilden sie lose Verbindungen mit den Zuckern, die deren Löslichkeit erhöhen. Die Zucker haben in Lösung eine starke Affinität zu Wassermolekülen, die vornehmlich an die Hydroxylgruppen gebunden werden. Ihre Affinität zu neutralen organischen Molekülen ist dagegen gering. Die Verteilung eines Zuckers in einer wässrigen und einer organischen Phase hängt von dem verfügbaren Wasser ab. Der Wassergehalt der Zellulose beeinflusst die Zusammensetzung des Lösungsmittels wahrscheinlich nur in geringem Masse, sodass die Verteilung eines Zuckers zum grossen Teil vom Wassergehalt des Lösungsmittels bestimmt wird und damit auch von der Löslichkeit des Wassers in der organischen Phase. - Die Affinität eines Zuckers zu Wassermolekülen und die Stärke der Bindung zwischen den Zuckermolekülen im Kristall stehen in Beziehung zueinander. Der Schmelzpunkt ist ein Mass für die Stärke dieser Bindung, die hier zwischen den Hydroxylgruppen besteht.

Ein bei hoher Temperatur schmelzender Zucker hat eine grosse Affinität zur stationären wässrigen Phase und einen entsprechend niedrigen Rf-Wert. Dies trifft für Aldopentosen und -hexosen zu, für Ketohexosen nicht ganz entsprechend. Zucker, die sich in dieser Beziehung anders verhalten, liegen in festem und gelöstem Zustand in verschiedenen Formen vor.

Jermyn und Isherwood ordneten die Zucker in einer Übersichtstabelle nach ihrer Form, Konfiguration und ihren Substituenten. Bei einigen Gruppen wurden auch die Schmelzpunkte angeführt (50). Ein Überblick lässt verschiedene Gesetzmässigkeiten erkennen. Zwischen der Konfiguration und den Rf-Werten der Zucker besteht ein Zusammenhang. Mit den einzelnen Substituenten wechseln die Rf-Werte. Furanosen wandern schneller als Pyranosen. Zucker, bei denen eine Hydroxylgruppe oben bzw. unten am Ring ist, haben differente Rf-Werte. Wenn Cis-Konfiguration vorliegt, wandern die Zucker schneller als bei Transkonfiguration. Dies gilt besonders für Aldopentosen und Ketohexosen, weniger für Aldohehexosen. Wenn ein Substituent ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) am C-Atom 5 des Pyranoserings gebunden ist, so ist der Einfluss jeder Hydroxylgruppe davon abhängig, ob sie auf derselben Seite des Ringes liegt wie der Substituent oder nicht. Dabei ist für die einzelnen C-Atome die Wirkung auf den Rf-Wert verschieden. Ist kein Substituent vorhanden oder an C 1 ein Substituent gebunden (Pyranosering der Ketohexosen), so bestimmt die Wechselwirkung zwischen benachbarten C-Atomen den Rf-Wert (Cis- und Transform).

Methylierte Zucker wandern schneller als nichtmethylierte, wobei die Geschwindigkeit mit der Zahl der Methylgruppen zunimmt.

Das Verhalten der Zucker auf dem Papierchromatogramm liegt also weitgehend in ihrer Konstitution begründet.

### Anwendungen der Papierchromatographie der Zucker auf organische Substrate

Die Weiterentwicklung der Papierchromatographie der Zucker ist eng mit ihrer praktischen Anwendung verknüpft. Bei der Aufarbeitung organischen Materials traten immer wieder neue Probleme auf, und diese wurden der Anlass nach neuen Wegen zu suchen. Auf diese Weise hat sich der Anwendungsbereich der papierchromatographischen Analyse in den letzten Jahren stark erweitert.

Den Kliniker interessierte vor allem das Material aus dem menschlichen und tierischen Organismus. Schon Partridge wandte sich in seinen Arbeiten der Untersuchung von fötalem Schafblut und der spezifischen Substanz der Blutgruppe A zu (76). Er fand als ihre Zuckerbausteine Galaktose, Glukosamin und Fukose. Auch die aus Polysacchariden des Ruhrbakteriums (Shiga) gewonnene Galaktose, Rhamnose und das Glukosamin liessen sich papierchromatographisch darstellen (76).

Freie Zucker von Blut und Harn erwiesen sich als für die Papierchromatographie geeignet. So gewann Horrocks Glukose, Laktose, Maltose und andere Zucker aus dem Harn (45, 46).

Riffart, Decker und Wagner arbeiteten eine quantitative Erfassung der Harnzucker aus mit Isopropyl, Eisessig und Wasser (7:2:1) als Lösungsmittel und Benzidin als Sprühreagenz (81).

Hamerman untersuchte hydrolysiertes und unhydrolysiertes Material aus dem Harn. Er dialysierte seine Substrate gegen Wasser und fand Fukose, Hexuronsäuren, Hexosamine, Hexosen (Mannose und Galaktose) und manchmal Glukose (39).

Die Verwertung injizierter Lävulose (Fruktose) im gesunden und kranken Organismus stand im Interesse der Arbeiten von Wallenfells (95). Ein Vergleich der aus Blutserum dargestellten Fruktose mit Hilfe des Papierchromatogramms ergab für einige Krankheitsbilder erhöhte Werte. So fand sich bei Fettsucht, schwerer Hepatitis, Leberzirrhose und auch in der Schwangerschaft eine verzögerte Fruktoseverwertung.

Die Zusammenhänge zwischen Blut- und Harnzuckern bestätigten papierchromatographische Untersuchungen von Baumgarten (3). Bei Gesunden und Diabetikern fand er als freie Zucker Glukose, Fruktose, Laktose, Inosit und einige andere nicht identifizierte Zucker im Blut. Der Harn von Diabetikern enthielt zum Teil dieselben Substanzen, der von Gesunden war zuckerfrei (3).

Spezifische Polysaccharide von gram-negativen Bakterien wurden von Davies aus Antigenen isoliert und ihre Zuckerbausteine papierchromatographisch untersucht (23).

Aus Tragenthscleim und Mucigenen von Kröten- und Froscheiern gewannen Masumune und Yosizawa mit Hilfe der Papierchromatographie Disaccharide, Hexuronsäuren und Hexosamine (64).

Bei der Säurehydrolyse von Galaktogen werden D- und L-Galaktose in verschiedenem Verhältnis abgeschieden. Die Bestimmung der zu bestimmten Zeitpunkten der Hydrolyse gebildeten Mengen an D- und L-Zuckern führten May und Weinland papierchromatographisch durch (67). Sie eluierten die Zucker aus dem Papier und errechneten aus dem Drehwert der Lösung das D : L-Verhältnis der Galaktosen. Auch die bei der Hydrolyse auftretenden Zwischenprodukte wurden so isoliert und durch mehrmaliges Chromatographieren gereinigt. Sie erwiesen sich als  $\alpha$ - und  $\beta$ -galaktosidisch gebundene Disaccharide.

Die Anwendung der Papierchromatographie auf Herzglykoside beschreiben Bally, Heftmann und Lawday (2, 41, 59).

## Untersuchungen der Glykoproteide des Blutserums.

Die vor allem in den letzten Jahren mehr und mehr in den Vordergrund tretenden Untersuchungen der Glykoproteide des Blutserums weckten das Interesse einer genauen Kenntnis ihrer Polysaccharidbausteine. Die Ausarbeitung chemischer Bestimmungsmethoden durch zahlreiche Autoren hat auf diesem Gebiet schon zu sehr guten Ergebnissen geführt. Es wurde möglich normale und pathologische Seren verschiedener Krankheitsbilder in dieser Hinsicht zu vergleichen und bis zu einem gewissen Grad statistisch zu bewerten. Über Versuche, die Papierchromatographie zur Charakterisierung dieser Stoffe heranzuziehen, liegen noch wenige Arbeiten vor.

Werner und Odin untersuchten Seromucoid,  $\alpha_2$ -Globulin, Euglobulin und andere Glykoproteine (98). Sie führten eine saure Hydrolyse der Eiweisskörper durch und trennten dabei mit 0,5 n-Schwefelsäure in 2 Stunden bei 100 Grad C. Galaktose und mit 1-2 n-Schwefelsäure unter denselben Bedingungen Mannose und Glukosamin vom Eiweiss ab. Die Zucker wurden mit Pyridin/Amylalkohol und Lutidin/Amylalkohol chromatographiert und mit Anilinhydrogenphthalat sichtbar gemacht.

Auch Südhof, Schröder und Mundorf führten papierchromatographische Bestimmungen an Serumeiweisszuckern Gesunder und Kranker aus. Sie behandelten die Eiweisskörper wie folgt: Alkoholfällung und Waschen des Niederschlages, Hydrolyse mit 1-n-Salzsäure 3 Stunden im kochenden Wasserbad, Abzentrifugieren des Bodensatzes. Die Chromatographie erfolgte absteigend mit Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) 55 - 60 Stunden. Die Flecke wurden mit Anilinphthalat entwickelt und im ultravioletten Licht photographiert. Die Autoren untersuchten so Seren, Pleurapunktat, Rinderglobulin und  $\beta$ -metallbindendes Globulin. Sie trennten die Zucker Galaktose, Mannose und Glukosamin.

## Hydrolyse von Glykoproteidlösungen.

Das Problem der Hydrolyse war eine der dringlichsten Fragen auf dem Gebiet der Glykoproteidanalyse.

Die bei Säurehydrolyse von Glykoproteiden auftretenden Zuckerzerstörungen und die Bildung von braunen Huminkörpern führten Dixon und Mitarbeiter dazu, eine neue Möglichkeit der Hydrolyse zu suchen (29). Er fand bei Underwood und Deatherage (1952) die Beschreibung einer Hydrolyse von Kaffeeproteinen mit Dowex 50. Diese Autoren stellten fest, dass ein guter Teil der Aminosäuren vom Austauscher absorbiert wird und keine Huminkörper gebildet werden. Neutrale Zucker blieben nicht am Austauscher haften.

Nach Dixon entstehen die schwarzen unlöslichen und die braunen Huminkörper wahrscheinlich aus frei gewordenen neutralen Zuckern und Aminosackern

oder Aminosäuren. So verbindet sich z. B. Tryptophan mit neutralen Zuckern zu Humin. Dixon versuchte, die von Underwood und Deatherage angegebene Hydrolyse auf das von ihm untersuchte Glykoproteid des Eies zu übertragen. Die Trennung von Aminosäuren und neutralen Zuckern durch den Austauscher liess erwarten, dass die Wechselwirkungen der beiden Stoffgruppen aufeinander ausblieben. Ausserdem schien eine Schädigung der Zucker durch die notwendige hohe Wasserstoffionenkonzentration herabgesetzt, da die Ionen hier nur in unmittelbarer Nachbarschaft mit dem unlöslichen Austauscher vorliegen. Das von Dixon auf diese Weise hydrolysierte Glykoproteid ergab bei der papierchromatographischen Trennung neutrale Zucker, Aminosucker und Aminosäuren.

Nach Dixon ist eine Vorbehandlung des Austauschers mit 4-n-Salzsäure, 4-n-Kochsalzlösung und Wasser von 100 Grad C notwendig, um ihn von löslichen Substanzen zu befreien. Bariumsulfat entfernte Dixon durch Ausfällen mit Bariumhydroxyd und entfärbte den Austauscher mit Darco G 60 (Holzkohle). Dixon verwandte auch Duolit C 3 und Amberlit IR 120-H. Vom Ionenaustauscher wird im Lauf der Hydrolyse Schwefelsäure frei, die aber erst nach 48 Stunden eine solche Konzentration erreicht, bei der Zucker zerstört werden. Substrate, die der Hydrolyse am Austauscher unterworfen werden, dürfen nicht durch Salze verunreinigt sein, da aus dem Ionenaustauscher äquivalente Mengen an Säure freigesetzt werden. Die maximale Wirkung der Hydrolyse auf Zucker ist nach 4, auf Aminosäuren nach 16 Stunden erreicht (Dixon, 29).

Eine ähnliche Hydrolyse wandten Glegg und Mitarbeiter an (36). Diese Autoren untersuchten die Mucopolysaccharide des Bindegewebes. Sie führten qualitative papierchromatographische Bestimmungen von Fukose, Mannose, Glukose und Galaktose aus an Substraten von elastischem Gewebe, Sehnen, Lunge Linsenkapsel, Haut, Knorpel und Knochen.

Schultze, Schmidtberger und Haupt unterbauten ihre chemischen Zuckerbestimmungen an isolierten Plasmaproteiden ( $\alpha_1$ -Seromucoid,  $\alpha_2$ -Makroglobulin,  $\beta_1$ -metallbindendes Globulin, Fibrinogen, Pseudo- und Eu- $\gamma$ -Globulin) mit papierchromatographischer Kohlenhydratanalyse. Sie entwickelten mit der von Dixon angegebenen Hydrolyse eine Methode zur Darstellung von Mannose, Galaktose und Fukose. Der verwendete Dowex 50 (Vernetzungsgrad 12 %) wurde mit 4n-Salzsäure, 4n-Kochsalzlösung und Wasser von 100 Grad C. behandelt. Für jede Analysenprobe wurden Proteid, Austauscher und destilliertes Wasser im Verhältnis 1 : 200 : 600 angesetzt, das Gemisch eingeschmolzen und einer 4-stündigen Hydrolyse unter ständiger Bewegung bei 100 Grad C ausgesetzt. Anschliessend wurde der Austauscher abfiltriert, das Filtrat neutralisiert und eingeeengt. Die Papierchromatographie wurde mit Butanol/Pyridin/Wasser (8:6:3) aufsteigend durchgeführt und die Zucker mit Anilinphthalat entwickelt. Aus den Chromatogrammen liess sich ein visueller Vergleich über die relativen Mengen der einzelnen Zucker gewinnen (86).

## Entfernung störender Stoffe mit Ionenaustauschern.

Schon die ersten Untersuchungen an organischem Material, die Partridge an Apfelsaft, Eiweiss und fötalem Schafblut vornahm, ergaben, dass gewisse Stoffe des Gewebes die Chromatographie beeinträchtigen (75). Als solche erkannte Partridge Elektrolyte und suchte sie mit Zeo-Karb 215 und Deacidit zu entfernen.

Wallenfells entionisierte enteweisstes Serum mit Amberlit IR 120 (Kationenaustauscher) und Amberlit IR 4B (Anionenaustauscher (95)).

Die Anwendung der Papierchromatographie auf organische Substrate ist meist mit den beiden oben angeführten Problemen verbunden. Die Bemühung um eine geeignete Hydrolyse und die Entfernung der Stoffe, die die Trennung auf dem Papier ungünstig beeinflussen, sind die Voraussetzung für papierchromatographische Analysen einzelner Zuckerbausteine.

# EIGENE UNTERSUCHUNGEN ZUR ANALYSE VON GLYKOPROTEIDEN (Nachweis von Galaktose, Mannose und Fukose)

Unsere im folgenden beschriebenen Untersuchungen befassen sich mit den Glykoproteiden des Blutserums. Sie wurden im Rahmen der Arbeiten über die papierchromatographische Charakterisierung der Kohlenhydratbausteine von Serumeiweisskörpern im Eiweisslaboratorium der I. Medizinischen Universitätsklinik München durchgeführt. Wir haben uns vor allem mit den neutralen Zuckern Galaktose, Mannose und Fukose beschäftigt. Auf Nachweise von Hexosaminen soll hier nicht näher eingegangen werden.

## Hydrolyse

Um die Zuckeranteile vom Eiweiss abzutrennen und die einzelnen Komponenten zu gewinnen, bedienten wir uns der Hydrolyse mit Salzsäure und nahmen sie in 2-normaler Konzentration bei 100 Grad C 12 Stunden lang vor. Die Eiweisskörper waren zuvor von den frei im Blut gelösten Zuckern (Glukose, Fruktose) durch Alkoholfällung und Nachwaschen des Niederschlags mit Alkohol getrennt worden.

Für die Hydrolyse von Proteinen schlägt Block vor, 200 mg Protein mit 20 ml 6n-Salzsäure zu versetzen und 18 - 24 Stunden einer Temperatur von 100 Grad C auszusetzen (12).

Turba hydrolysierte 1 - 10 mg Protein mit 10 ml 6n-Salzsäure oder 8n-Schwefelsäure 20 Stunden bei 100 Grad C (91).

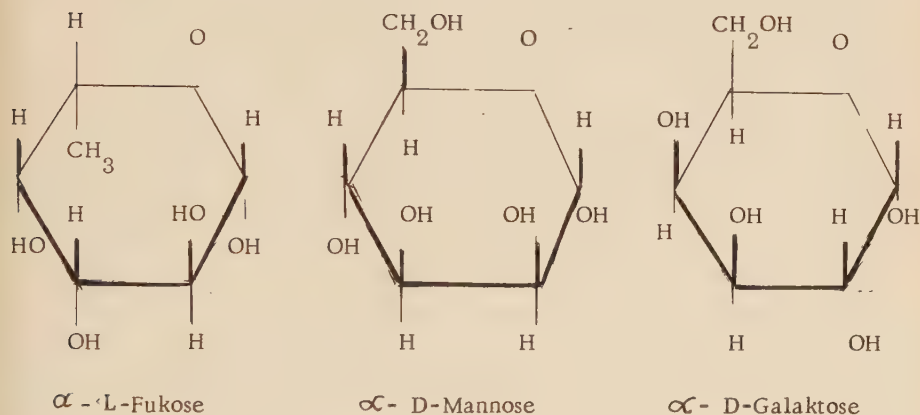
Die Galaktogenhydrolyse (5 ccm Galaktogen und 5 ml 0,2- oder 2n-Schwefelsäure), die von May und Weinland 24 stündig durchgeführt wurde, erreichte nach 21 Stunden ihren Höhepunkt (67).

Werner und Odín hydrolysierten Glykoproteide mit 0,5n- bzw. 1-2n-Schwefelsäure 2 Stunden bei 100 Grad C zur Gewinnung der Zucker (98) und Südhoof und Mitarbeiter mit 1n-Salzsäure 3 Stunden im kochenden Wasserbad.

Die Hydrolyse von Serumglykoproteiden am Kationenaustauscher bei 100 Grad C wurde von Dixon (27) und Schultze mit Mitarbeitern (86) 4-stündig und für Substanzen des Bindegewebes von Glegg und Mitarbeitern 16-stündig durchgeführt.

## Struktur der Zucker

Die Zucker liegen in festem und gelöstem Zustand in der Ringform vor, Fukose, Galaktose und Mannose als Pyranosen. Fukose hat als Pentose und methylierter Zucker einen höheren Rf-Wert. Die beiden Hexosen unterscheiden sich vor allem durch ihre Konfiguration.



## Vorbereitung der Eiweisshydrolysate für die Chromatographie

Bei der Chromatographie der gewonnen Eiweisshydrolysate ergaben sich insofern Schwierigkeiten, als die Substratlösungen verschiedene Substanzen enthielten, die die Trennung der einzelnen Zucker auf dem Papier erheblich störten. Hier war vor allem an Salze zu denken, die aus den Ionen der Substratlösung und den Ionen der hydrolysierenden Säure entstehen können. Auch bildeten sich während der Hydrolyse Huminkörper von löslicher und unlöslicher Form und brauner Farbe. Nach Abfiltrieren der letzteren und Einengen der Substratlösung bekamen wir eine visköse, braune Substanz, die sich nur schwer auf das Papier auftragen liess. Ob auch Aminosäuren, die aus den Eiweissanteilen der Proteide entstehen oder grössere Eiweisspaltprodukte den chromatographischen Trenneffekt herabsetzen, lässt sich aus unseren Versuchen nicht sagen.

Wir versuchten auf verschiedene Weise eine Reinigung unserer Hydrolysate zu erzielen.

### 1. Entfernung der Säure.

Durch Entfernung der Säure liess sich erwarten, einen wesentlichen Faktor der Salz-bildung auszuschalten. Wir liessen die Säure von der Oberfläche der Substratlösung

her verdampfen wie später noch beschrieben wird (Seite 41). Die zurückbleibende Restlösung wurde mit Aqua bidest. gewaschen und wiederum eingengt. Diesen Arbeitsvorgang wiederholten wir mehrmals. Das so gewonnene Substrat war viskös und braun. Auf dem Papierchromatogramm zeigten sich breite, unscharfe und dunkle Flecke. Der Nachweis von Hexosaminen aus solchen Substratlösungen wurde mit der Methode von Stoffyn und Jeanloz versucht (88). Dabei liess sich mit Hilfe einer entsprechenden Testlösung Arabinose (aus Glukosamin) bestimmen. Die hellroten Flecke auf dem Chromatogramm waren aber diffus und daher unscharf.

## 2. Entsalzen mit Pyridin.

Eine weitere Möglichkeit der Entsalzung legten die Versuche von Malpress und Morrison nahe (62). Bei ihren Untersuchungen von Brustdrüsengewebe wandten sie mit Erfolg eine Methode der Entsalzung an, die darauf beruht, dass sich in Pyridin Zucker lösen und Salze und auch andere Rückstände ausfallen. Wir behandelten unsere Substrate nach dem angegebenen Verfahren: Einengen der Substratlösung zur Trockene, Versetzen mit einem Überschuss an Pyridin, Verrühren des Gemisches, Einwirken einer Temperatur von 100 Grad C für 10 Minuten, Abzentrifugieren der zuckerhaltigen Pyridinlösung und Verdampfen des Pyridin bei niedriger Temperatur (20 - 30 Grad C). Der Rückstand wurde ein 2. Mal mit Pyridin behandelt. Die Präparate erwiesen sich als gereinigt, doch waren die Zuckerverluste zu hoch. Mannose und Galaktose erschienen als gut getrennte Flecke auf dem Chromatogramm. Fukose war nicht nachzuweisen.

## 3. Hydrolyse mit Dowex 50.

Die von Schultze, Schmidtberger und Haupt angegebene zuckerschonende und zu reinen Substratlösungen führende Hydrolyse mit Dowex 50 (86) erwies sich für uns als weniger günstig, da sie eine Apparatur erfordert, mit der grosse Flüssigkeitsmengen eingengt werden können. Wir kamen durch eine Überschlagsrechnung zu folgendem Ergebnis: Jede Analysenprobe soll 10 mg Hexosen enthalten. Wir nahmen einen mittleren Hexosengehalt (einschliesslich Hexosamine) von 200 mg % im Serum an, 10 mg Hexosen wären dann in 5 ml Serum enthalten. Diese 5 ml Serum haben bei einem Durchschnittswert von 7 % Serumprotein einen Eiweissgehalt von 0,350 g. Nach dem Ansatz von Schultze und Mitarbeitern sollen Protein, Austauscher und Aqua dest. zur Hydrolyse im Verhältnis 1:200:600 stehen. Nach unseren Berechnungen würden dem folgende Werte entsprechen: 0,350 g Protein, 70 g Dowex 50 und 210 ml Wasser. Gibt man nach dem Abfiltrieren der löslichen Hydrolysenprodukte durch die Glasfritte die doppelte Menge des Ansatzvolumens an Aqua dest. durch den nachzuwaschenden Rückstand (Austauscherharz mit adsorbierten Stoffen), so hat man als Endprodukt etwa 600 ml Substratlösung. Bei den uns zur Verfügung stehenden Möglichkeiten erforderten diese Voraussetzungen eine zu grosse Apparatur, und es bedeutete eine erhebliche zeitliche Belastung für uns, diese Flüssigkeitsmenge einzuengen.

#### 4. Entsalzen mit Dowex 50.

Schliesslich versuchten wir unsere Substratlösungen mit Hilfe des Kationenaustauschers Dowex 50 zu entsalzen.

##### Dowex 50.

Dowex 50 ist ein Kunstharz. Man gewinnt es durch Kopolymerisation von Styrol und Divinylbenzol und erhält je nach der Menge des verwendeten Divinylbenzols ein verschiedenes Netzwerk. Der Vernetzungsgrad (angegeben in % Divinylbenzol) ist mitbestimmend für den Durchtritt von Molekülen. Die Korngrösse bestimmt die Grösse der austauschenden Oberfläche. Funktionell wirksam sind die Sulfogruppen des Harzes. Der Austauscher ist maximal widerstandsfähig gegen mechanische Beanspruchung, Oxydation, Reduktion, zeigt Temperaturbeständigkeit bis über 100 Grad C und ist in organischen Lösungsmitteln unlöslich. Er besitzt die Azidität einer starken Mineralsäure und ist in seiner Kapazität unabhängig vom pH der durchlaufenden Lösung.

##### Vorbehandlung.

Die Bestleistung von Dowex 50 erzielt man, wenn er vor der Anwendung vorbehandelt wird. In dem von der Fabrik (Fluka AG Buchs Schweiz und Serva-Entwicklungslabor Heidelberg) gelieferten Austauscher sind noch lösliche Produkte (besonders Farbstoffe) enthalten. Ihre Entfernung gelingt durch mehrmaliges Waschen mit 4n-Salzsäure. Dadurch wird auch der Austauscher maximal mit Wasserstoffionen beladen. Für unsere Zwecke war es notwendig, anschliessend die überschüssigen Ionen, besonders Chlorionen, aus dem Austauscher auszuwaschen. Wir spülten so lange mit Aqua bidest., bis mit Silbernitratlösung kein Niederschlag mehr auftrat. Dabei erfolgte auch die für eine gute Arbeitsleistung des Austauschers erforderliche Quellung. Will man grössere Mengen von Lösungen oder Wasser in der Säule durch den Austauscher tropfen lassen, kann man sich folgendermassen helfen: Das Austauscherrohr wird oben mit einem Glastrichter versehen, der in einem Gummistopfen fest sitzt. Über dem Trichter befestigt man einen Glaskolben, der die Spülflüssigkeit enthält und mit seinem Hals in den Trichter eintaucht. Das Auslaufen der Säule und damit den Zutritt von Luft kann man verhindern, wenn man die aus der Säule austropfende Lösung durch einen Schlauch in ein Gefäss nach oben leitet, dessen Flüssigkeitsspiegel dem des Austauschers entspricht.

##### Arbeitsbedingungen.

Während des Ionenaustausches zwischen Substratlösung und Austauscher sollte eine bestimmte Kontaktzeit bestehen. Wir liessen 20 ml in der Stunde durchtropfen. Die Höhe einer Austauschersäule bestimmt die Durchlaufgeschwindigkeit der Lösung. Bei einer Säule von 7 cm Höhe und 1 1/2 cm Durchmesser (10 g Harz in 13 ml Wasser) erreichten wir eine günstige Tropfgeschwindigkeit ohne weitere Regulation. Nach dem Durchtropfen der Substratlösung spülten wir mit einem 10-fachen Volumen an Wasser nach, um die löslichen Substanzen und mit ihnen vor al-

Ihm die uns interessierenden Zucker möglichst ohne Verluste zurückzugewinnen. Der Austauscher soll stets von Flüssigkeit bedeckt sein. Jede eingebrachte Luftblase verkleinert die Kontaktfläche zwischen Austauscher und Lösung.

#### Austauschermenge.

Eine Berechnung der Menge des notwendigen Austauschers lässt sich nur überschlagsmässig durchführen. Die Austauschkapazität von Dowex 50 beträgt 50 - 115 g Kalziumkarbonat je Liter Harz (Biochemisches Taschenbuch, H. M. Rauen, 1956 (79)).

Wenn man eine Kapazität von 100 g Kalziumkarbonat je Liter Harz annimmt (= 2 Äquivalente), so ist der Wert für einen ml 2 mÄquivalente. Grössenordnungsmässig kam der Ionengehalt unserer untersuchten Substrate etwa in den Bereich von 1 mÄquivalent. Man könnte also schon mit sehr kleinen Mengen an Harz auskommen. Wir beobachteten aber noch eine weitere Wirkung des Austauschers. Die Substratlösungen wurden durch Dowex 50 entfärbt und von Verunreinigungen befreit. Die Verunreinigungen der Lösungen scheinen die Austauscherkapazität herabzusetzen. So erwiesen sich Lösungen, die nach der Hydrolyse unfiltriert durch die Säule gegeben wurden als weniger gut entionisiert und gereinigt. Die papierchromatographische Trennung der Zucker war nicht so scharf. Möglicherweise lagern sich manche der Stoffe an die aktiven Austauschergruppen an oder werden von ihnen gebunden. Wir arbeiteten daher mit einem Überschuss an Harz und spülten nach dem Ionenaustausch gründlich mit Wasser nach, um die Verluste an Zuckern möglichst klein zu halten.

#### Die Austauschersäule.

Als Austauschersäule verwendeten wir Chromatographierohre von folgenden Grössen: 40 cm Länge und 1 1/2 cm Durchmesser und 25 cm Länge und 1 cm Durchmesser. Bei den letzteren war die Tropfgeschwindigkeit weit niedriger als notwendig. Die Glasfritte am unteren Ende des Rohres war so fein, dass Körnchen des Austauschers zurückgehalten wurden. Am Glasansatz unter der Fritte war ein verstellbarer Tropfhahn angebracht.

#### Einbringen der Substratlösung.

Die Substratlösungen wurden mit einer Pipette nahe der Oberfläche des Austauschers aufgebracht und nachher mit der nachgegebenen Spülflüssigkeit in einem Messgefäss aufgefangen.

#### Wirkung des Austauschers.

Die Arbeit mit dem Ionenaustauscher führt zu fast ionenfreien, schwach gefärbten Substratlösungen, die sich gut auf das Papier auftragen lassen.

Nach Untersuchungen verschiedener Autoren (Underwood und Deatherage 1952 und Dixon 1955 (29)) werden auch Aminosäuren vom Austauscher adsorbiert, sodass eine teilweise Entfernung dieser Substanzen zu erwarten ist. Für die Aminozucker liegen ähnliche Verhältnisse vor. Sie können sogar unter bestimmten Bedingungen quanti-

tativ an der Säule festgehalten werden (Sven Gardell (35)). Wir selbst versuchten aus unseren Substratlösungen Glukosamin und Galaktosamin nach Stoffyn und Jeanloz (88) papierchromatographisch nachzuweisen, fanden aber auf den Chromatogrammen nur deutliche Flecke für Galaktose und Mannose.

### Die chromatographische Apparatur

Wir bedienten uns der absteigenden Methode der Papierchromatographie, die in Glasküvetten ausgeführt wurde. (Masse: 60;50;21 cm und 60;31;20 cm Höhe, Breite und Tiefe). Der Spalt zwischen Kammer und Deckel wurde mit Exsiccatorfett abgedichtet. Im Glasdeckel befanden sich noch 2 bzw. 1 verschliessbare kleine Öffnung zum Einbringen des Lösungsmittels. Zwei unserer Kammern hatten Glaströge, die über ein vom Boden der Küvette aufsteigendes Glasgestänge gelegt wurden. Die dritte Kammer war mit 2 Metalltrögen ausgerüstet (Material V 4 A-Stahl), die mit ihren Füßchen auf seitlich angebrachten Metallschienen standen. Parallel dem Trogrand liefen jeweils zwei schmale, runde Glasstäbe. Die Tröge wurden für jedes neu eingebrachte Chromatogramm mit 60 - 80 ml Lösungsmittel beschickt. Zur Raumsättigung diente die wässrige Phase des Lösungsmittels, die 6 Stunden vor Chromatographiebeginn in eine Schale am Boden der Kammer gegeben wurde. Der Papierstreifen tauchte mit seinem oberen Ende in den Trog und war am Trogrand über dem seitlich von diesem laufenden Glasstab so abgefaltet, dass er von dort senkrecht nach unten hing. Im Trog selbst wurde er mit einem dickeren Glasstab beschwert und so festgehalten.

Die Glasküvetten waren in einem Holzschrank mit Glasfenster untergebracht, in dem eine konstante Temperatur erhalten werden konnte. Diesem Zweck diente eine elektrische Heizung mit selbsttätiger Wärmeregulation und einem Warmluftverteiler. Wir stellten die Temperatur unter Kontrolle des Thermometers auf 26 Grad C ein.

An Papieren verwendeten wir die von Schleicher und Schüll gelieferten Sorten 2043 a und 2043 a Gl. Die Trennung der Zucker war bei beiden gut, die Laufgeschwindigkeit bei letzterem etwas grösser. Die Grösse der Bogen wählten wir mit 20 auf 58 cm und versahen das untere Ende mit einer symmetrischen Spitze, die 7 cm vom unteren Papierrand begann. Auf diese Weise konnten wir Durchlaufchromatogramme mit einer Laufzeit von 2 1/2 bis 3 Tagen herstellen. Die Laufrichtung des Lösungsmittels wird von der herstellenden Firma mit einem Pfeil am Rand des Papiers markiert. Die Zucker wurden auf einer horizontalen Linie in 7 bis 10 cm Abstand vom Papierrand aufgetragen. Die gegenseitige Entfernung der einzelnen Lösungsgemische betrug 4 - 5 cm.

Das Besprühen der Chromatogramme erfolgte mit einem Zerstäuber, der an eine Stickstoffflasche angeschlossen wurde. Der Zerstäuber konnte mit seinem Schliff-

ansatz auf den das Sprühreagenz enthaltenden Kolben aufgesetzt werden. Das in die Flüssigkeit tauchende Glasrohr lief im Mundstück des Zerstäubers zu einer schmalen Düse aus, an der das Reagenz in feine Tröpfchen zerblasen wurde. Gleichzeitig wurde die Saugwirkung des Stickstoffstromes über ein weiteres Glasstück auf den Kolbeninhalt übertragen.

Die Chromatogramme sollen nicht zu schwach und nicht zu stark besprüht werden. Im ersteren Fall besteht die Gefahr, dass die Flecke verwaschen werden. Auch färbt sich das Papier nachher beim Erhitzen leicht gelb an und dunkelt rasch nach. Zu schwach besprühte Chromatogramme braucht man nur ein zweites Mal mit Reagenz zu behandeln.

### Testlösungen

Zur Identifizierung der einzelnen Zucker wurde jedes Chromatogramm mit Testlösungen von Galaktose, Mannose und Fukose versehen. Diese wurden in 0,5 %iger Lösung hergestellt und im Kühlschrank aufbewahrt.

### Beschreibung der angewandten Methode

Mit den oben aufgezeigten Grundlagen konnten wir folgende Methode ausarbeiten.

#### 1. Entfernung von frei im Serum gelösten Zuckern.

Das aus Blut durch Zentrifugieren gewonnene Serum wird von den geformten Blutbestandteilen abgehoben. Die frei im Serum gelösten Zucker werden dadurch entfernt, dass das Serumeiweiss ausgefällt und von der überstehenden Flüssigkeit (ent-eiweisstem Serum und Fällungsmittel) getrennt wird. Die Fällung erfolgt mit absolutem oder 96 %igem Alkohol, wobei je ml Serum 45 bzw. 50 ml Alkohol verwendet werden. Man lässt die Fällungsflüssigkeit eine halbe Stunde einwirken. Dann wird sie hochtourig vom Eiweiss abzentrifugiert, abgegossen und der Eiweissrückstand ein 2. Mal mit Alkohol ausgewaschen. Der Alkohol wird wiederum durch hochtouriges Zentrifugieren entfernt. Das so gewonnene Eiweiss löst man in ca. 2 ml Aqua bidest. und setzt dazu 1 - 2 Tropfen n-Natronlauge.

#### 2. Hydrolyse der Eiweisslösung.

Die Hydrolyse der Eiweisslösung erfolgt mit Salzsäure. Man gibt von einer starken Salzsäure (z.B. 8n-HCl) soviel zu, dass 2-Normalität erreicht wird. Dabei trübt sich die Eiweisslösung, indem Eiweiss denaturiert wird. In Glasröhrchen mit geschliffenem Glasstopfenverschluss wird die Substratlösung 12 Stunden im Wasserbad von 100 Grad C gehalten. Es fallen braune Huminkörper aus, die mit Glasfaserpapier (Schleicher und Schüll M 8) abfiltriert werden. Die Substratlösung ist von brauner Farbe (lösliche Huminkörper).

### 3. Entfernung der Salze.

Mit Hilfe eines Kationenaustauschers (Dowex 50) lassen sich die salzbildenden Kationen der Lösung fast ganz entfernen. Der angewandte Dowex hat einen Vernetzungsgrad von 8 % und eine Korngrösse von 200 - 400 mesh und besitzt eine gute Leistungsfähigkeit bei niederem pH.

Der von der Fabrik gelieferte Austauscher wird mit 4n-HCl so lange ausgewaschen, bis die überstehende Säure nicht mehr braungrün sondern klar ist. Dann bringt man den Austauscher in ein Chromatographierohr und lässt 4n-HCl durchtropfen (je 10 g Dowex oder 13 ml Harz in Wasser 100 bis 200 ml Säure). Der Austauscher arbeitet umso besser je mehr er mit Säure durchgespült ist. Zum Entfernen der Chlorionen entnimmt man am besten den Austauscher der Säule und spült ihn im Glaskolben so lange mit Aqua bidest., bis sich nach Zugabe von Silbernitratlösung keine Chlorionen mehr nachweisen lassen. Dowex 50 W, der nur schwach gefärbt ist, wurde von uns ebenfalls mit gutem Erfolg verwendet. Für eine Serumausgangsmenge von 2 ml (Proteingehalt 150 - 200 mg) werden 13 ml des so vorbereiteten Dowex verwendet.

Die oben beschriebene Substratlösung wird auf 4 oder 5 ml eingeeengt und in der Chromatographiesäule durch Dowex gegeben. Anschliessend spült man mit der 10-fachen Menge an Aqua bidest. nach. Die Durchlaufzeit soll für 20 ml ungefähr eine Stunde betragen. Am Flammenphotometer lässt sich eine Entfernung beispielsweise der Natriumionen bis fast 0 % der ursprünglichen Lösung feststellen.

### 4. Einengen der Substratlösung.

Im Gefriervacuum wird die Lösung bis auf etwa 4 ml eingeeengt. Weitere Konzentrierung des Substrates erfolgt im kleinen unten zugespitzten Gläschen durch Abdampfen der Flüssigkeit im Luftstrom bis auf ca. 0,1 ml. Das Gläschen wird mit zweifach durchbohrtem Gummistopfen verschlossen, durch den 2 Glasröhrchen geführt sind. Das eine ist an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen, das andere steht in Verbindung mit der Aussenluft. Das Abdampfen des Wassers wird durch Erwärmen der Substratlösung im Wasserbad begünstigt.

### 5. Papierchromatographie der Zucker.

Das eingeengte Substrat wird auf einen Papierbogen der Fa. Schleicher und Schüll (2043 a) mit einer Elektrophoresepipette auf möglichst kleiner Fläche aufgetragen. Bei einer Ausgangsmenge von 2 ml Serum wurden 2 mal 0,01 ml aufgetragen. Nimmt man einen Hexosengehalt des Serums von 80 mg% und ein 1:1-Verhältnis der Zucker Mannose und Galaktose an, so wären ohne Berücksichtigung der Verluste durch die Methode ca 80 Gamma jedes dieser Zucker in 0,01 ml zu erwarten, für Fukose bei einem mittleren Gehalt von etwa 10 mg% 20 Gamma. Als Lösungsmittel zur Chromatographie eignet sich das von Partridge angegebene Gemisch von Butanol, Eisessig und Wasser im Verhältnis 4:1:5 (obere Phase). Man lässt es bei Anwendung der absteigenden Methode im Thermostaten (26 Grad C) 3 Tage

durch das Chromatogramm laufen. Neben der Substratlösung wird das Gemisch einer Testlösung, das je 50 Gamma Galaktose, Mannose und Fukose enthält, aufgetragen (von einer 500 mg%igen Lösung der einzelnen Zucker je 0,01 ml). Die Papierbogen trocknet man im Trockenschrank bei ca. 80 Grad C.

Das Entwickeln der Chromatogramme erfolgt mit Aniliphtalat (0,93 g Anilin, 1,66 g Phthaleinsäure in 100 ml wassergesättigtem Butanol (78)). Nach dem Besprühen tritt die Farbreaktion im Trockenschrank bei 100 Grad C nach ungefähr 10 Minuten ein.

Die Zucker lassen sich als bräunliche Flecke nachweisen, da aus ihnen durch Einwirken von Säure (Abspaltung von Wasser) ein Stoff entsteht, der mit Anilin (Kopplungsreagenz) einen braunen Farbstoff bildet. Das Nachdunkeln der Chromatogramme und das Verblassen der Flecke lässt sich vermeiden, wenn man mit 5 %iger Natriumthiosulfatlösung 15 Minuten fixiert und danach gut mit Wasser nachspült.

## Ergebnisse

Das oben beschriebene Verfahren wurde auf Blutserum und Eiweissfraktionen desselben, insbesondere auf die Gammafraktion und Paraproteine angewendet. Die untersuchten Eiweissfraktionen waren durch präparative Papierelektrophorese gewonnen worden und enthielten keine freien Zucker mehr. Die gebundenen Eiweisszucker Galaktose, Mannose und Fukose liessen sich aus Hydrolysaten von Seren und Fraktionen papierchromatographisch darstellen. Dabei erfolgte eine deutliche Trennung der einzelnen Komponenten entsprechend ihren verschiedenen Rf-Werten. Fukose wandert am schnellsten, Galaktose am langsamsten. Dies entspricht den Feststellungen von Isherwood und Jermyn über die Konstitution der Zucker und ihr Verhalten auf dem Papierchromatogramm.

Aus den Chromatogrammen lassen sich relative Schlüsse auf die Anteile der einzelnen Zucker am Eiweisskörper ziehen. So ist im Serum der Fukosegehalt deutlich geringer als die enthaltene Menge an Galaktose und Mannose. Die beiden letzteren Zucker entsprechen sich etwa.

$\gamma$ -Globuline und Paraproteine haben einen viel grösseren Fukoseanteil.

Aus den Chromatogrammen können die getrennten Zucker durch Eluieren gewonnen werden.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit gab einleitend einen Überblick über die Kohlenhydratbausteine in menschlichen und tierischen Proteinkohlenhydratverbindungen.

Anschliessend wurde die Anwendung der Chromatographie, insbesondere der Papierchromatographie, zur Trennung von Zuckern aus Lösungsgemischen beschrieben.

Es wurden verschiedene Methoden zur Darstellung von Zuckern aus Glykoproteiden erörtert. Dabei erwies sich ein Verfahren als besonders geeignet, bei dem die Hydrolysate der Glykoproteidlösungen mit Dowex 50 gereinigt und danach papierchromatographisch verarbeitet wurden. Es liessen sich die Hexosen Galaktose und Mannose sowie die Methylpentose Fukose scharf trennen. Die Untersuchungen wurden an Blutseren, an Lösungen von Eiweissfraktionen des Blutserums (beta- und gamma-Globulinen) und an Paraproteinen durchgeführt.

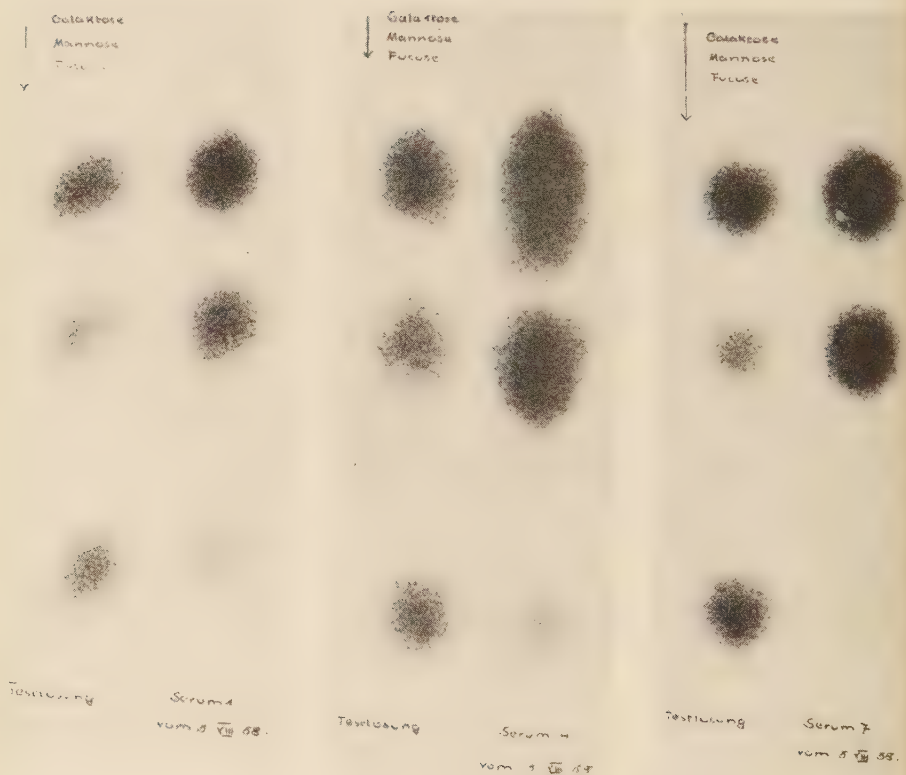


Abbildung 1

Papierchromatographie der eiweissgebundenen Zucker nach ihrer Freisetzung durch Hydrolyse. - Links jeweils die Testlösungen, rechts die getrennten eiweissgebundenen Kohlenhydrate (von oben nach unten: Galaktose, Mannose, Fucose).

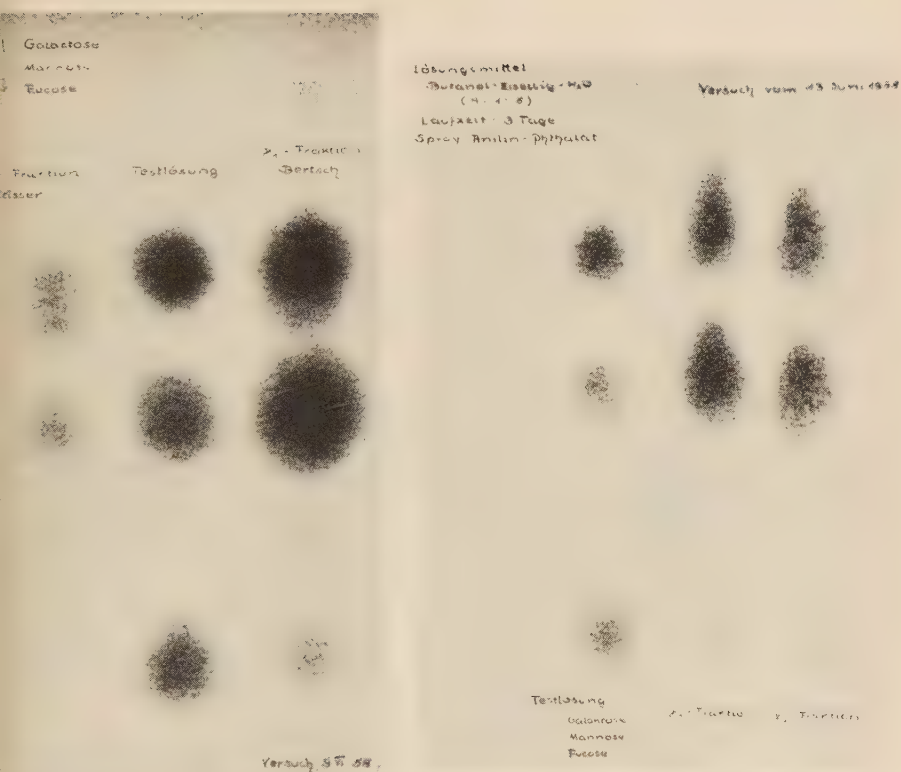


Abbildung 2

Papierchromatographie der eiweissgebundenen Zucker in isolierten Eiweissfraktionen. - links: Untersuchung einer  $\beta$ - und einer  $\gamma_1$ -Globulinfraktion, rechts: Untersuchung einer  $\gamma_1$ - und  $\gamma_2$ -Globulinfraktion. In diesem Serum hatte die  $\gamma_1$ -Globulinfraktion einen paraproteinartigen Charakter. Zum Vergleich jeweils Testlösungen. (Die getrennten Kohlenhydrate von oben nach unten: Galaktose, Mannose und Fucose).

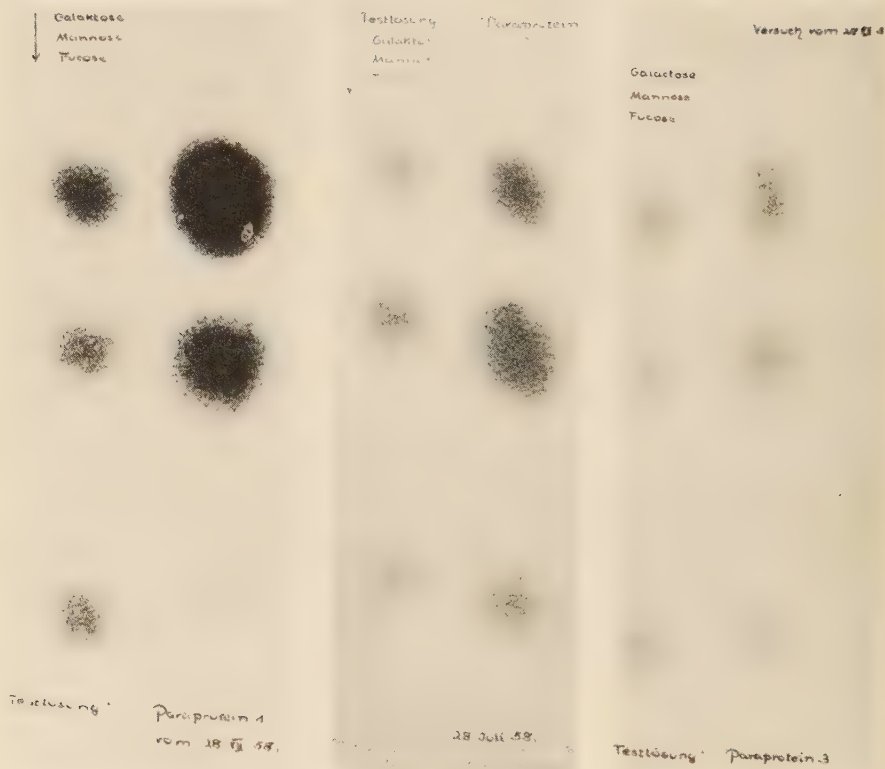


Abbildung 3

Papierchromatographie der eiweissgebundenen Zucker. Untersucht wurden Paraproteine (3 Fälle von Plasmocytom). Bei Paraprotein (links) im Vergleich zu den sehr stark hervortretenden Flecken für Galaktose und Mannose nur geringer Gehalt von Fucose.

Für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, sowie für die freundliche Unterstützung der experimentellen Arbeiten möchte ich Herrn Professor Dr. H. SCHWIEGK, Herrn Dr. M. KNEDEL und Herrn Dr. M. JACUBEIT meinen herzlichen Dank aussprechen.

## LITERATUR

1. J. Badin, M. Schubert, M. Vouras:  
J. Clin. Invest. 34, 1317 (1955).
2. P. R. O. Bally, O. Schindler, T. Reichstein:  
Helv. Chim. Acta 1952, 35, 673.
3. F. Baumgarten: Deutsche Zeitschrift für Verdauungs- und Stoffwechs-  
selkrankheiten. Band 15, Heft 4-5 (1955).
4. D. J. Bell: J. Chem. Soc. 1944, 473.
5. H. Bergstermann: Theoret. Medizin. Jg. 8, Heft 9, 377.
6. H. Bergstermann: Ergeb. Inn. Med., Neue Folge 7, 1 (1956).
7. T. Bersin, A. Müller: Helv. Chim. Acta 1952, 35, 475.
8. H. Bierry: C. r. Acad. Sci. (Paris) 191, 1381 (1930).
9. Binkley und Wolfrom:  
Repts. Sugar Research Foundation, No. 10, New  
York (1948)
10. Blix, Gottschalk, Klenk:  
Nature 179 (1957) 1088.
11. Blix, Tiselius, Svenson:  
Journ. of biolog. Chem. 137, 493, 1941.
12. R. J. Block, E. L. Dunnen, G. Zweig:  
A Manual of Paper Chromatographie and Paper  
Electrophoresis Academic Press Inc., Publishers  
New York 1955.
13. L. Boggs, L. S. Cuendet, J. Ehrental, R. Koch, F. Smith:  
Nature 1950, 166, 520.
14. R. A. Boissonas: Helv. Chim. Acta 1947, 30, 1689.
15. F. Brown, E. L. Hirst, L. Hough, J. K. N. Jones, H. Wadman:  
Nature 1948, 161, 720.
16. J. L. Bryson, T. J. Mitchelli:  
Nature (London) 167, 864 (1951)
17. P. Burtin, P. Grabar, G. Boussier, M. F. Jayle:  
Bull. Soc. Chim. Biol. 36 (1954) 1029.

18. E.Chargaff, Cella Levine, Ch.Green;  
Journal of Biological Chemistry 175, 67, 1948.
19. G.H.Coleman, C.Mc.Closkey;  
J. Am. Chem. Soc. 1943, 65, 1588.
20. G.H.Coleman, A.H.Farnham, A.Miller;  
J. Am. Chem. Soc. 1942, 64, 1501.
21. F.Cramer;  
Papierchromatographie. Verlag Chemie GmbH.  
Weinheim Bergstr. 1958.
22. M.Cramer;  
Diplomarbeit Heidelberg 1948.
23. D.A.Davies;  
The Biochem. Journal, Vol. 59, No. 4, 55.
24. P.Decker, W.Riffart;  
Chemiker Ztg. 74, 273 (1950).
25. R.Dectonder;  
Bull. soc. chim. France 1952, 874-883.
26. H.F.Deutsch;  
J. biol. Chem. 224 (1957) 767.
27. Z.Dische;  
Biochem. Z. 201, 74 (1928).
28. Z.Dische, M.Jacubeit;  
Federation. Proc. 14, 203 (1955)
29. J.Dixon;  
Biochemisches Journal, Vol. 60, Nr. 1, 1955.
30. E.F.Mc Farren, Kathleen Brand, H.R. Rutkowski;  
Analyt. Chemie 23, 1146 (1951).
31. P.Fischer-Jorgensen;  
Dansk. Tids Farm 1950, 24, 1. C.A. 1950, 44,  
2893-e.
32. F.G.Fischer, H.Dörfel;  
Hoppe-Seyler's Ztschr. f. Phys. Chemie. Bd. 297,  
1954.
33. Fischer und Nebel;  
Hoppe-Seyler's Ztschr. f. Phys. Chemie. Bd. 302,  
1955.
34. W.G.C. Forsyth;  
Nature (London), 161, 239 (1948).
35. S.Gardell;  
Acta chemica Scandinavia 7 (1953) 207-215.
36. R.E.Glegg, D.Eidinger, C.P.Leblood;  
Technical Papers 120, 839 (1954).
37. J.Goa;  
Scand. J. clin. Laborat. Investig. 7, 5 (1955).
38. A.Grüne;  
Chimia, Vol. 11, St. 51.

39. D. Hamerman, F. T. Hatch, A. Reife:  
The J. of Laboratory and Clinical Medicine.  
St. Louis, Dez. 55.
40. Haurowitz: Kolloid Z., 74 (1936) 208.
41. E. Heftmann, A. J. Levant:  
J. Biol. Chemie 1952, 194, 703.
42. Susumu Hirax, Choji Araki, Sus. Nakaniski:  
Bulletin of the Chemical Society of Japan Vol. 26,  
Nr. 4, pp. 183-184 (1953).
43. E. L. Hirst, L. Hough, J. K. N. Jones:  
Discuss. Faraday, Soc. 7, 271 (1949).
44. E. L. Hirst, J. K. N. Jones: J. Chem. Soc. (London) 1949, 1659.
45. R. H. Horroks: Nature (London) Vol. 164, 444, Sept. 49.
46. R. H. Horroks: Lancet 1949, 1, 1042-45.
47. L. Hough, J. K. N. Jones, W. H. Wadman:  
J. Chem. Soc. 1949, 2511.
48. L. Hough, J. K. N. Jones, W. H. Wadman:  
J. Chem. Soc. (London) 1950, 1702.
49. C. D. Hurd, R. P. Zelinski:  
J. Am. Chem. Soc. 1947, 69, 243.
50. F. A. Isherwood, M. A. Jermyn:  
Biochem. Journal Vol. 98 (1951).
51. Jayme und Knolle: Angewandte Chemie 1956, 243.
52. M. A. Jermyn, F. A. Isherwood:  
Biochem. Journal Vol. 44, 1949, 402.
53. J. K. N. Jones: J. Chem. Soc. 1944, 333.
54. J. X. Khym, L. P. Zill: J. Am. Chem. Soc. 1951, 73, 2399.
55. E. Klenk: Z. Phys. Chemie 1951, 288, 216.
56. E. Klenk, K. Lauenstein: Z. Phys. Chemie 1951, 288, 220.
57. E. Köiw, A. Grönwall: Scand. J. clin. Invest. 4 (1952) 244.
58. L. Langstein: Hofmeisters Beitr. z. chem. Physiol. und Patholog.  
1. 259 (1901/02).

59. D. Lawday: Nature 1952, 170, 415.
60. E. u. M. Lederer: Chromatographie a Review of Principles and Applications.  
Elsevier Publishing Company. 1955.  
Amsterdam - Houston - London - New York.
61. H.F. Linskens: Papierchromatographie in der Botanik.  
Springer Verlag 1955  
Berlin - Göttingen - Heidelberg.
62. F. Malpress, A. Morrison: Nature (London) 164, 963 (1949).
63. H. Masamune: 3. Intern. Kongress f. Biochemie. (Brüssel 1955).
64. H. Masamune, Z. Yosizawa:  
Tohoku J. Exper. Med. 59, 1-9, 1953.
65. H. Masamune, Z. Yosizawa, M. Maki:  
Tohoku J. Exper. Med. 1951, 53, 217.  
C A 1951, 45, 9576-d.
66. A.M. Mattson, C.O. Jensen:  
Ind. Engng. Chem. analyt. Edit. 22, 182 (1950).
67. F. May, H. Weinland: Hoppe Seyler's Ztschr. f. Phys. Chemie 305 (1956)
68. J.J. Mertzweiler, D.M. Carney, F.F. Farley:  
J. Am. Chem. Soc. 1943, 65, 2367.
69. K. Mörner: Zbl. Physiol. 7, 581 (1883).
70. W. T. J. Morgan, D. Aminoff:  
Nature (London) 162, 579 (1948).
71. W. H. Mc Neely, W. W. Binkley, M. L. Wolfrom:  
J. Am. Chem. Soc. 1945, 67, 527.
72. C. Neuberg: Ber. dtsch. chem. Ges. 34, 3963 (1901).
73. E. J. Norberg, J. Auerbach, R. M. Hixon:  
J. Am. Chem. Soc. 1945, 67, 342.
74. S. M. Partridge: Nature, Vol. 158, Page 270, Aug. 24, 1946.
75. S. M. Partridge: Biochem. J. Vol. 42, Nr. 2, 1948.
76. S. M. Partridge: Biochem. J. Vol. 42, Nr. 2, 1948.
77. S. M. Partridge: Nature London, 164, 443 (1949).

78. E. Pascu, T. P. Mora, P. W. Kent:  
Science (New York). 110, 446 (1949).
79. H. M. Rauen:  
Biochem. Taschenbuch, St. 1124, 1956.
80. W. S. Reich:  
Biochem. J. 1939, 33, 1000.
81. W. Riffart, P. Decker, H. Wagner:  
Klin. Wochenschrift 30 (1952) Nr. 15/16.
82. H. Südhof, H. Kellner: Physiol. und klin. Bedeutung kohlenhydrathalt.  
Körperstoffe. (Basel, New York 1957).
83. H. Südhof, R. Schröder, H. G. Mundorf:  
Deutsches Archiv f. klin. Medizin. Bd. 202, 1956.
84. O. E. Schultz, R. Gmelin: Ztschr. f. Naturforschung, Heft 1, 1954.
85. H. E. Schultze: Deutsche Mediz. Wochenschrift. 83. Jahrg. Nr. 39.
86. H. E. Schultze, R. Schmidtberger, H. Haupt:  
Biochem. Ztschr. Bd. 329, Heft 6, 1958, 490-507.
87. Sary, M. Yuvanidis: Biochem. Ztschr. Bd. 324, 206-213 (1953).
88. P. J. Stoffyn, R. Jeanloz: From the R. W. Lovett Memorial Laboratories,  
Massachusetts General Hospital and the Department  
of Biological Chemistry, Harvard Medical School  
Boston Massachusetts. (Eigene Mitteilung).
89. E. A. Talley, D. R. Reynoldes, W. L. Evans:  
J. Am. Chem. Soc. 1943, 65, 575.
90. H. Tauber: Analyt. Chemistry 25, 826 (1953).
91. F. Turba: Chromatograph. Methoden in der Proteinchemie.  
Springer Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg  
1954.
92. H. Venner, W. Herb: Hoppe-Seyler's Ztschr. f. Phys. Chemie. Bd. 308  
Heft 1, 1957.
93. H. Venner, W. Herb: Hoppe-Seyler's Ztschr. f. Phys. Chemie Bd. 308,  
Heft 1, 1957.
94. K. Wallenfells: Naturwissenschaften 37, 491 (1950).
95. K. Wallenfells: Ärztl. Forschung 5/1, 430, 1951.

96. K. Wallenfells, E. Bernt, G. Limberg:  
Angewandte Chemie 65, 581 (1953).
97. J. Werner:  
Acta chem. scand. (Copenh.) 5, 1396 (1951).
98. J. Werner, L. Odin:  
Experientia 5, 233 (1949).
99. Westall:  
Biochem. J. 1948, 42, 249.
100. F. Weygand:  
Arkiv Kemi 1950, 3, 11.
101. F. Weygand, H. Hofmann:  
Chem. Ber. 83, 405 (1950).
102. R. Winzler, Mehl, Humphrey:  
Studies on the Mucoproteins of human Plasma.  
1948.
103. R. Winzler:  
Advances in Cancer Research.  
Vol. 1, Academic Press, New York 1953, p. 503.
104. C. Zanetti:  
Gazz. chim. ital. 33, 1, 160 (1903).

## L E B E N S L A U F

Am 19. August 1927 wurde ich in Berlin-Zehlendorf als Tochter von Dr. med. Paul Schmid und Babette Schmid geb. Gall geboren. Meine Eltern siedelten 1928 nach Schorndorf in Württemberg über, wo ich von 1934 - 1938 die Grundschule besuchte und anschliessend bis 1946 die Oberschule. Im Juli 1946 legte ich die Reifeprüfung ab. Anschliessend erwarb ich die Erlaubnis zur Ausübung der Kranken- und Säuglingspflege und war als Sprechstundenhilfe tätig.

Im Mai 1954 begann ich das Medizinstudium an der Universität Tübingen, wo ich im Herbst 1956 das Physikum machte. Im Mai 1957 wechselte ich zur Universität München über, wo ich am 17. Dezember 1959 das Staatsexamen ablegte. Seit Januar 1960 arbeite ich als Medizinalassistentin an der II. Medizinischen Universitätsklinik in München.

München, Sommer 1960.

Esther Schmid







